

SÉRIE , N° 1862

N° D'ORDRE : 2729

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yvette ARMAND

1^{re} THÈSE. — Rapports entre la Spécificité sérologique et la Constitution chimique de quelques Antigènes.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

13 MARS 1939

Soutenues le

1939 devant la Commission d'examen.

MM. ROBERT-LÉVY, *Président.*

AUBEL

WURMSER

} *Examineurs.*

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1939

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yvette ARMAND

1^{re} THÈSE. — Rapports entre la Spécificité sérologique et la Constitution chimique de quelques Antigènes.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1939 devant la Commission d'examen.

MM. ROBERT-LÉVY, *Président.*

AUBEL
WURMSER } *Examineurs.*

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe

Professeurs honoraire



H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
Emile PICARD.
LÉON BRILLOUIN.
GUILLET.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.

BLAISE.
DANGEARD.
LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD
LAPICQUE.

G. BERTRAND
ABRAHAM.
Ch. FABRY.
LÉON BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSQ.
BOHN.
RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY . . T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Emile BOREL . . T Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jean PERRIN . . T Chimie physique.
E. CARTAN . . . T Géométrie supérieure.
A. COTTON . . . T Recherches physiques.
J. DRACH . . . T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
Charles PÉREZ . T Zoologie.
M. GUICHARD . . T Analyse et mesures chimiques.
Paul MONTEL . . T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.
L. BLARINGHEM. T Botanique.
G. JULIA T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
C. MAUGUIN . . . T Minéralogie.
A. MICHEL-LÉVY T Pétrographie.
H. BÉNARD . . . T Mécanique expérimentale des fluides.
A. DENJOY . . . T Application de l'analyse à la Géométrie.
L. LUTAUD . . . T Géographie physique et Géologie dynamique.
Eugène BLOCH . T Physique.
G. BRUHAT . . . T Physique théorique et Physique céleste.
E. DARMOIS . . . T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNE . . T Physique générale et Radioactivité.
A. DUFOUR . . . T Physique (P. C. B.).
L. DUNOYER . . . Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND T Botanique.
M. JAVILLIER . . T Chimie biologique.
ROBERT-LÉVY . . T Physiologie comparée.
F. PICARD Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Henri VILLAT . . T Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB T Géologie.
P. PASCAL T Chimie générale.
M. FRÉCHET . . . T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. ESCLANGON . . T Astronomie.
M^{me} RAMART-LUCAS. T Chimie organique.

H. BÉGHIN . . . T Mécanique physique et expérimentale.
FOCH Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER . . . Physique (P. C. B.).
De BROGLIE . . . T Théories physiques.
CHRÉTIEN Optique appliquée.
P. JOB Chimie générale.
LABROUSTE . . . Physique du Globe.
PRENANT T Anatomie et histologie comparées.
VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
COMBES T Physiologie végétale.
GARNIER T Mathématiques générales.
PÈRES Mécanique théorique des fluides.
HACKSPILL . . . Chimie (P. C. B.).
LAUGIER T Physiologie générale.
TOUSSAINT . . . Technique Aéronautique.
M. CURIE Physique (P. C. B.).
G. RIBAUD T Hautes températures.
CHAZY T Mécanique rationnelle.
GAULT Chimie (P. C. B.).
CROZE Recherches physiques.
DUPONT T Théories chimiques.
LANQUINE T Géologie structurale et Géologie appliquée.
VALIRON Mathématiques générales.
BARRABÉ Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT Biologie animale (P. C. B.).
F. PERRIN Théories physiques.
VAYON Chimie organique.
G. DARMOIS . . . Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
CHATTON T Biologie maritime.
AUBEL Chimie biologique.
J. BOURCART . . . Géographie physique et Géologie dynamique.
M^{me} JOLIOT-CURIE. Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL . . . Biologie végétale (P. C. B.).
CABANNES Enseignement de Physique.
GRASSÉ Biologie animale (P. C. B.).
PRÉVOST Chimie (P. C. B.).
BOULIGAND . . . Mathématiques.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire . . . D. TOMBECK.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON COUSIN

LE DOCTEUR E. BUC

*Qui a toujours suivi et encouragé mes
études scientifiques, je dédie cette thèse en
témoignage d'affectueuse admiration.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROBERT LÉVY

Professeur de Biologie à l'Ecole Normale

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. AUBEL

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Paris

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. WURMSER

Directeur de Laboratoire de Biophysique de l'Ecole des Hautes-Etudes

*Qui nous ont fait l'honneur d'accepter de
faire partie du Jury de cette thèse.
Hommage de gratitude.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR L. MARTIN

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur
Grand officier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR G. RAMON

Membre de l'Académie de Médecine
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur
Commandeur de la Légion d'honneur

A MONSIEUR R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

Docteur ès Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Officier de la Légion d'honneur

*Qui a bien voulu nous accueillir dans son
Service et diriger nos travaux. En témoignage
de profonde reconnaissance.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR N. KOSSOVITCH

De l'Institut Pasteur

Qui a dirigé notre travail de ses conseils éclairés, en témoignage de vive reconnaissance pour ses encouragements et sa constante bienveillance à notre égard.

A MONSIEUR ET MADAME J. TRÉFOUEL

Chefs de Travaux du Laboratoire de Chimie Thérapeutique
de l'Institut Pasteur

Que nous remercions très sincèrement pour l'aide précieuse et amicale qu'ils nous ont apportée au cours de nos recherches.

A MES CAMARADES DE LABORATOIRE

INTRODUCTION

I



DEPUIS près d'un demi-siècle, le problème de l'immunité a provoqué de nombreuses et importantes recherches. Le sens du terme « immunité » s'est beaucoup élargi depuis les premiers travaux de 1890 qui avaient trait au pouvoir bactéricide des sérums.

Limitée jusqu'alors à l'étude des réactions provoquées par les microbes, toxines ou venins, l'immunologie a vu son horizon s'élargir considérablement lors de la découverte des sérums hémolytiques en 1898, par J. BORDET. Ce dernier a décrit, avec GENCOU, la réaction de fixation du complément dont EHRLICH a donné un schéma explicatif.

En 1901, UHLENHUTH a introduit le test de précipitation comme procédé médico légal. NUTTAL a repris ces travaux sur la spécificité stricte entre les espèces animales.

En 1902, RICHET et PORTIER, puis ARTHUS attirèrent l'attention sur un état particulier d'hypersensibilité, créé à la faveur d'injections répétées de substances albuminoïdes. Cette hypersensibilisation aux protéides étrangers a reçu le nom d'anaphylaxie. Elle peut être pathologique, alimentaire ou médicamenteuse. Elle peut se transmettre héréditairement. A part quelques exceptions elle est spécifique par rapport à l'antigène injecté.

On connaît les si importants travaux de BESREDKA sur l'anaphylaxie et la « vaccination antianaphylactique », et ceux du Prof. PASTEUR-VALLÉRY-RADOT sur les états allergiques, les modes de sensibilisation et les processus de désensibilisation.

* * *

L'usage s'est établi de grouper sous l'appellation générale d'antigènes, toutes les substances capables de susciter *in vivo*

la formation d'anticorps (1) avec lesquels elles donnent des réactions spécifiques.

Ces antigènes peuvent avoir une constitution très variable. La théorie classique imposait la présence de protéides dans la molécule d'antigènes mais on a obtenu artificiellement des substances non protéiques (polyholosides des bactéries) douées d'un certain pouvoir antigénique.

Lorsqu'un immunsérum mis en contact avec une toxine, neutralise ses effets nocifs, on dit qu'il contient une « anti-toxine ». Il renferme une « agglutinine » lorsqu'il provoque le rassemblement en amas d'une suspension de microbes ; une « précipitine » s'il fait apparaître un précipité floconneux au sein d'une solution, une « opsonine » s'il favorise la phagocytose. La nature chimique des anticorps est encore peu connue. Ceux-ci sont déterminés par ce qu'ils font plutôt que par ce qu'ils sont.

Cependant de nombreux travaux sur les immunsérums ont permis d'extraire, des globulines, une fraction minime de substances qui renferme la presque totalité de l'anticorps. Mais on ne peut encore préciser si la molécule d'anticorps est simplement fixée sur une globuline ou si elle se confond avec elle.

Il existe à l'état normal, dans les organismes vivants, certains anticorps variables suivant le sujet ou l'espèce. Leur présence confère l'immunité naturelle. D'autre part, on peut provoquer artificiellement la formation *in vivo*, d'anticorps en inoculant l'antigène approprié. L'immunité est dite alors acquise.

G. RAMON a montré, en 1923, l'intérêt des mélanges d'antigène spécifique et de substances non spécifiques, pour la préparation rapide et la production de sérums antitoxiques de valeur très élevée : sa technique consistait à enrober les toxines non modifiées dans la lanoline ou dans l'huile cholestérolée. Pour réaliser la vaccination charbonneuse il opérerait à l'aide d'une seule injection du premier vaccin de PAS-

1. Les termes « antigène » et « anticorps » ont été créés par DEUTRE-DEUTSCH (1899).

TEUR, incorporé dans les corps gras ou additionné d'autres excipients.

La spécificité des réactions antigène-anticorps a été démontrée depuis longtemps pour les sérums anti-toxiques, puis pour les sérums anti-microbiens permettant de différencier non seulement l'espèce, mais même le type microbien (iso-anticorps). On sait également que les caractères d'origine des protéides sont faciles à déceler grâce aux anticorps spécifiques qu'ils suscitent *in vivo*.

En poursuivant l'étude de la spécificité sérologique, on a constaté que la formation classique d'iso-anticorps est souvent accompagnée d'autres anticorps capables de donner des immunoréactions avec des types voisins du corps antigénique microbien inoculé.

EHRlich envisageait l'existence de « récepteurs communs » dans ces divers antigènes naturels. Maurice NICOLLE parle de la nature complexe de ces derniers constitués toujours par une « mosaïque d'antigènes », formule heureuse, comme l'ont démontré les récents travaux américains sur les antigènes.

Certaines humeurs, certains extraits de tissus, provenant de diverses espèces animales, injectés au lapin, provoquent l'apparition d'hémolysines pour les globules rouges du mouton ou de la chèvre. Ces substances furent appelées hétéroantigènes ou antigènes FORSSMAN du nom du savant qui les découvrit. Ils font apparaître *in vivo* des hétéro-anticorps ou anticorps de FORSSMAN. Ces hémolysines existent à l'état naturel chez certains animaux.

Quant aux antigènes FORSSMAN, ils ne sont pas présents dans les extraits d'organe de tous les animaux. On a même pu, à ce point de vue, partager ceux-ci en deux groupes :

- 1° le groupe Cobaye qui possède l'antigène F ;
- 2° le groupe Lapin qui en est dépourvu.

En utilisant, non plus des extraits aqueux d'organes, mais des extraits alcooliques, on s'aperçut que ces solutions lipidiques étaient incapables de provoquer *in vivo* la formation d'anticorps. Elles donnaient cependant *in vitro* toutes les réactions immunologiques avec le sérum obtenu à partir d'un antigène de même constitution.

Ainsi KURT MEYER, en 1910-1911, montra que l'extrait alcoolique de certains Vers, ne provoque pas la formation d'anticorps spécifiques, mais fixe le complément *in vitro*.

Ces « antigènes incomplets » ont été très étudiés par LANDSTEINER qui leur donna en 1921, le nom général « d'haptènes ».

En recombinaut l'haptène avec un protéide quelconque, on reconstitue l'antigène complet. Ainsi les extraits lipidiques, peuvent être réactivés par des substances protéiques de n'importe quelle origine (bactério-, zoo- ou phytoprotéides).

Divers auteurs ont même signalé que des substances autres que les protéides, mais de poids moléculaire élevé, telles que le Kaolin ou le collodion sont capables de régénérer le pouvoir antigénique. Par contre, les matières protéiques ne sont pas toutes susceptibles d'activer les haptènes. Ainsi la gélatine n'est pas un antigène, ce que l'on explique par l'absence d'acide aminé cyclique dans sa constitution.

Après l'étude des haptènes microbiens, LANDSTEINER a établi la possibilité de créer des antigènes en combinant avec les protéides, des substances chimiquement définies.

Cette nouvelle conception d'haptènes chimiques est venue apporter une base solide à la théorie de spécificité des réactions sérologiques. Elle a permis, en effet, de comparer entre elles, des molécules dont quelques-unes seulement peuvent être conjuguées avec les protéides.

Les haptènes ont, entre autres, le pouvoir d'inhiber la réaction antigène-anticorps lorsqu'une relation chimique étroite existe entre l'haptène et le groupe spécifique de l'antigène. Les haptènes les plus simples ne produisent aucune précipitation perceptible au contact de l'antigène, ce qui semble dû à une trop grande solubilité de leur molécule et non au fait que leur poids moléculaire est trop faible. Certaines autres substances chimiques se sont comportées comme des « haptènes précipitants ».

*
* *
*

Ces importantes recherches sur la nature des antigènes et des haptènes ont fait naître une science nouvelle : l'Immuno-

Chimie. Elle se propose l'étude chimique des antigènes, des anticorps et surtout l'étude des réactions sérologiques qui se produisent *in vivo* et *in vitro* lorsque l'on injecte à des animaux des substances chimiquement définies.

Cette science s'est imposée, ces dernières années, grâce aux importantes recherches poursuivies par l'éminent savant LANDSTEINER et par toute son école.

Après l'ouvrage intéressant publié par WELLS en 1929, qui posait le problème des aspects chimiques de l'immunité, LANDSTEINER, dans une récente publication (1936) a exposé ses remarquables travaux sur la spécificité des réactions sérologiques. Il y établit la possibilité de créer des antigènes artificiels en combinant des protéides quelconques avec des substances chimiques de constitution définie simple (haptènes).

OBERMAYER et PICK avaient déjà signalé, en 1906, que les protéides du sérum, traités chimiquement par l'iode, le brome ou l'acide nitrique, conservaient leur pouvoir antigénique, mais présentaient une spécificité sérologique nouvelle.

Ainsi le sérum de cheval, soumis à l'action de l'iode suscitait la formation d'anticorps qui précipitaient ensuite au contact de tous les protéides iodés quelle que soit l'espèce du sérum utilisé. Ces auteurs concluaient donc à la disparition de la spécificité de provenance remplacée par une nouvelle spécificité chimique.

En 1897, HOPKINS, BLUM et VAUBEL avaient constaté dans le traitement des protéides par les halogènes, la substitution de l'iode dans le noyau de la tyrosine en ortho par rapport au groupement hydroxyle (diiodo 3-5 tyrosine isolée par OSWALD).

En 1929, BAUER et STRAUSS, étudiant la nitration des protéides mettaient en évidence une substitution dans les cycles de la tyrosine et du tryptophane. A la suite de ces travaux, on attribua la transformation des caractères sérologiques des protéides halogénés ou nitrés, aux modifications apportées sur les noyaux aromatiques.

Cependant WORMALL, reprenant en 1930, ces travaux sur les protéides concluait, que les structures cycliques n'étaient pas les seules responsables de la spécificité. Il semblait ressortir de ses expériences que les caractères d'origine n'étaient pas complètement détruits dans les xanthroprotéides.

Craignant que le traitement des protéides par l'acide nitrique concentré n'altérât fortement la molécule par oxydation ou hydrolyse, WORMALL utilisa une méthode douce d'halogénéation et de nitration (tétranitrométhane en solution neutre). Il obtint sensiblement les mêmes résultats qu'en opérant avec l'acide nitrique concentré.

BAUER et MURSCHHAUSER ont constaté, nous dit WORMALL, que seuls, des protéides labiles comme ceux du sérum perdent leurs caractères d'espèce et qu'il n'en est plus de même pour la caséine plus stable.

Ces résultats n'étaient donc pas tout à fait concluants et les recherches entreprises sur ce sujet méritaient d'être reprises et approfondies.

Un autre traitement des protéides fut appliqué par LANDSTEINER et PRASEK. Ces auteurs utilisèrent l'acide nitreux et constatèrent la disparition de tout caractère d'espèce. Ils observèrent en même temps une étroite parenté sérologique entre ces « diazoprotéides » et les protéides nitrés. Cette similitude pourrait provenir d'une identité des deux sortes d'antigènes. WORMALL a signalé, en effet, que les acides nitreux et nitrique pouvaient déterminer une nouvelle struture de la tyrosine du type quinoïde (phénomène de tautomérie).

Pour étudier la valeur spécifique de nombreux composés chimiques, LANDSTEINER et ses collaborateurs voulurent associer ces corps à des protéides antigéniques. Ils eurent l'idée d'appliquer la technique décrite par PAULY, en 1904, et qui consiste à copuler le protéide avec un sel de diazonium. Les antigènes obtenus furent appelés « azoprotéides » (1918).

Cette méthode, très intéressante, a permis d'obtenir des antigènes à partir de diverses molécules chimiques simples et d'étudier les différents immunsérums obtenus. Elle a aidé à démontrer que la spécificité sérologique est liée aux azocomposés et ne dépend plus, que pour une faible part, de la fraction protéidique de l'antigène.

Les fonctions acides libres modifient d'une façon particulièrement nette la spécificité de l'antigène de base.

LANDSTEINER et VAN DER SCHEER ont utilisé dans leurs recherches sur les azoprotéides deux tests sérologiques : la réaction de précipitation (antigène-anticorps) et celle dite

d'inhibition. Ces auteurs ont constaté que les azoprotéides à caractère acide (carboxylique, arsanilique) présentaient une spécificité différente de celle des antigènes dans lesquels le substituant neutre (halogène, alcoyle) occupait la même place.

Ils ont observé, en outre, que les azoprotéides dérivés des trois acides aminobenzoïques avaient des caractères immunologiques qui les différenciaient entre eux. La spécificité des réactions sérologiques est donc étroitement liée aux différentes positions occupées dans l'espace par le radical introduit sur le noyau benzoïque.

Ces études sur la stéréoisomérisation avaient déjà été entreprises par LANDSTEINER et ses collaborateurs en opérant sur les formes *d* et *l* des acides *p* amino-benzoyl-phénylamino-acétique et quelques temps après sur les acides *d*, *l*, *m*, tartraniliques. Après avoir injecté ces acides de forme *d* (diazotés et copulés avec du sérum) ils ont obtenu des anticorps ne réagissant pas avec la forme *l* et *vice versa*. Ils ont opéré de même une différenciation sérologique des acides fumarique et maléique.

Ces recherches furent étendues au cas des glucides, en 1929, par AVERY et GOEBEL. Ici, également, l'isomérisation optique exerce une grande influence sur les réactions immunologiques (glucose et galactose).

Plus récemment, DEJARRIC de la RIVIÈRE et KOSOVITCH ont étudié les formes *d*, *l*, *dl*, de quelques amino-acides (histidine leucine).

Poursuivant l'étude des facteurs de spécificité sérologique, LANDSTEINER observa les antigènes conjugués avec des chaînes linéaires, en utilisant comme matières premières des anilides de diacides aliphatiques. Les résultats des expériences ont prouvé que chaque azoprotéide correspondant à cette suite d'anilides, possédait une spécificité propre.

Etudiant le cas des chaînes peptidiques simples, LANDSTEINER et ses collaborateurs, ont constaté que la spécificité sérologique était liée à l'acide aminé terminal. Cependant ces auteurs ont pu noter une légère dissimilitude entre les polypeptides dont les aminoacides terminaux étaient identiques et qui ne différaient que par un seul aminoacide à l'intérieur de la chaîne.

Les recherches concernant l'influence des fonctions aminées sur la spécificité immunologique, n'ont pas amené de résultats aussi nets que les précédents.

Les auteurs ont tous procédé par dissimulation des fonctions aminées des protéides et comparaison sérologique avec les antigènes initiaux, mais ils ont employé des méthodes différentes et leurs résultats ne sont pas concordants.

LEWIS, par désamination de la caséine, à l'aide de l'acide nitreux, n'a observé après ce traitement aucun changement dans la spécificité sérologique.

ROSENAU et ANDERSON, en 1907, puis EISLER et LÖWENSTEIN, en 1912, ont opéré sur les protéides, par l'action du formol dans le but de bloquer les fonctions NH^2 . Ils ont de même constaté une inertie immunologique totale des fonctions aminées. Une objection contre cette méthode a été formulée par WADSWORTH et PANGBORN : l'action du formol peut, en effet, apporter d'autres modifications chimiques sur les protéides (cyclisation du tryptophane).

OBERMAYER et WILLHEIM, en 1912, puis récemment HORSFALL (1934) utilisant le même traitement au formol, ont observé, au contraire, une certaine variation de la spécificité d'origine.

RAMON, dans la préparation de son anatoxine, utilise l'action du formol sur certains protéides (toxine diphtérique ou tétanique). Il constate la disparition du caractère toxique sans altération du pouvoir antigénique.

HOPKINS et WORMALL (1933-1934) ont employé une méthode différente pour bloquer les fonctions aminées : par l'isocyanate de phényl. Ils ont constaté alors une disparition complète de tout caractère d'espèce initiale des protéides. Ici encore la technique n'est pas parfaite ; elle tend à introduire dans la molécule protéique de nouvelles structures aromatiques.

Pour toutes ces raisons, il était intéressant de reprendre l'étude de l'influence des fonctions aminées sur la spécificité immunologique.

Parallèlement à l'étude du problème des antigènes protéidiques, d'importantes recherches sur les glucides spécifiques se poursuivaient.

Les premiers travaux de PICK, ZINSSER et PARKER avaient fait

entrevoir l'existence, dans les corps microbiens, de principes actifs au point de vue sérologique quoique ne donnant pas les réactions des protéides.

Mais il a fallu attendre les importants résultats des travaux d'AVÉRY, GOEBEL, HEIDELBERGER et DUBOS pour que l'activité immunologique de plusieurs glucides fut démontrée. Les glucides des pneumocoques ont été les premiers étudiés. Travaillant sur les différents types de ce microbe, HEIDELBERGER et AVERY ont établi, en 1923, le rôle capital joué par certains polyholosides dans la constitution de l'antigène type et ils ont conclu à la nature glucidique de la substance spécifique. ZINSSER fut un des premiers à considérer cette substance résiduelle comme un haptène dans le sens attribué par LANDSTEINER.

Pour transformer les holosido-haptènes en antigènes complets, AVERY, TILLET et GOEBEL ont couplé le composé glucidique avec des séro-albumines ou des séro-globulines et ont injecté à l'animal ce mélange qui constitue bien un antigène complet puisqu'il détermine l'apparition d'anticorps spécifiques.

Les recherches de BOIVIN, L. et J. MESROBEANU, en 1933, ont conduit à une conception de l'antigène complet de certaines bactéries, différente de celle des auteurs américains. Grâce à une technique personnelle, BOIVIN et ses collaborateurs ont extrait de nombreux bacilles, un antigène complet glucido-lipidique. Puis à partir de ce complexe, ils ont éliminé les acides gras et conservé l'holosido-haptène.

RAISTRICK et TOPLEY, ont confirmé en 1934, l'existence d'antigènes bactériens non protéidiques.

De nombreux travaux ont trait au pouvoir antigénique des complexes glucido-lipidiques de certaines bactéries (*Salmonella*, *Proteus*, *Pasteurella*, etc...).

BOIVIN poursuit l'étude des propriétés chimiques, biologiques et toxiques de ces antigènes.

MACHEBŒUF et ses collaborateurs ont étudié les haptènes du bacille tuberculeux. Ces auteurs ont montré que, parmi toutes les fractions lipidiques extraites du bacille de Koch, seules les substances solubles dans l'alcool froid et insolubles dans l'acétone possèdent la propriété de fixer l'alexine en présence du sérum de tuberculeux. Ils ont montré, de plus, que l'activité « haptène de fixation » des extraits du bacille de Koch,

est bien due à des lipides et non à des impuretés de nature protéidique fixées aux lipides.

Enfin ces dernières années, de nombreux travaux ont été entrepris sur les haptènes chimiques. L'existence des phénomènes de sensibilisation provoquée, chez l'homme, était connu depuis les expériences de RICHET et PORTIER. Divers auteurs, et particulièrement LANDSTEINER ont poussé plus loin les recherches et à l'heure actuelle, on connaît un grand nombre de substances douées d'un certain pouvoir sensibilisant vis-à-vis des animaux.

Low, en 1924, avait produit chez les êtres humains un état d'hypersensibilité avec des extraits de *Primula*, et CASH, en 1911, avait déjà employé un alcaloïde dans le même but.

Sur les animaux, les meilleurs résultats furent obtenus par BLOCH et STEINER qui sensibilisèrent la peau des cobayes avec des primulines cristallisées. Plus récemment, LANDSTEINER et ses collaborateurs ont utilisé comme haptènes sensibilisants: le chloronitrobenzène et l'arsénobenzol.

La sensibilisation est obtenue plus sûrement avec les phénols et les amines aromatiques. NITTI, BOVER et Mlle DEPIERRE (1937) ont étudié les relations entre la structure chimique des amines de la série *p* phénylène diamine et leur pouvoir sensibilisant. Ils ont constaté que les positions 1-4 sont les plus favorables. D'autre part, l'activité de la molécule est exaltée par des radicaux tels que NH^2 , CH^3 , OCH^3 : elle est pratiquement annulée par l'existence en position 2, de radicaux électronégatifs.

BERGER et ERLNMEYER ont observé un rapport étroit entre le pouvoir pharmacologique et le pouvoir sérologique de certaines substances (dérivés du pyrazolone).

FIERZ-DAVID et ses collaborateurs poursuivent actuellement d'importantes recherches sur la sensibilisation des animaux à l'aide de simples composés chimiques. Ils ont ainsi provoqué un état d'hypersensibilité chez le cobaye en utilisant le produit de copulation de l'acide *p* phénylarsinique diazoté, avec le sulfoanthranilate de sodium.

LANDSTEINER et VAN DER SCHEER ont prouvé dernièrement, que la participation des protéides de l'organisme n'était pas indispensable pour déclencher la réaction chez des animaux

sensibilisés par des azoprotéides quelconques. Ils opéraient sur un fragment musculaire isolé de ces animaux et obtenaient une forte contraction par simple addition, dans le bain, de l'azocomposé correspondant. Il était pourtant ici impossible d'envisager la copulation de l'haptène avec une substance protéique (1).

Cependant le fait qu'une substance non anaphylactogène peut être transformée en substance anaphylactogène par l'organisme lui-même (avec le concours des protéides qu'elle y rencontre) reste prouvé.

II

Il nous a paru intéressant de poursuivre des recherches en nous basant sur ces données nouvelles de l'Immuno-Chimie et voici comment nous avons été amenée à étudier spécialement quelques questions qui se rapportent à cette science.

Les conclusions qu'OBERMAYER et PICK avaient tirées de leurs travaux, ayant été contestées par WORMALL qui n'a pas observé la disparition totale du caractère d'espèce des protéides nitrés, il nous a semblé intéressant de reprendre tout d'abord l'étude des xanthoprotéides en utilisant un grand nombre de réactions sérologiques et allergiques tant au point de vue de la disparition des caractères d'origine que de la nouvelle influence du groupe nitré ajouté aux protéides.

Nous avons également repris l'étude immunologique des groupements acides en utilisant la méthode de diazotation décrite et appliquée si largement par LANDSTEINER et toute son école. Nous avons étendu nos recherches aux azoprotéides dérivés des acides arylaminés arsanilique, sulfanilique, aminobenzoïque de forme ortho, méta ou para. Nous avons cherché les rapports de spécificité entre ces divers antigènes.

Nous avons ensuite étudié l'influence des fonctions aminées fixées sur les noyaux aromatiques des protéides. Les importants travaux de J. TREFOUEL, Mme TREFOUEL, NITTI et BOVER sur la réduction *in vivo* de certains azoïques (dérivés du p-aminophénylsulfamide) nous ont incitée à étudier les relations

1. Technique de Schultz-Dale décrite p. 30.

sérologiques qui peuvent exister entre les azoprotéides et leurs produits de réduction que nous avons appelés : aminoprotéides. Nous avons examiné ce nouvel antigène : son pouvoir sensibilisant et immunisant. Nous avons tenté de déterminer si le caractère d'espèce des protéides initiaux avait définitivement disparu ou si, simplement masqué dans les azoprotéides par le sel de diazonium, il était capable de réapparaître après réduction de ceux-ci.

Nous avons comparé les aminoprotéides obtenus par la coupure des azoprotéides et ceux résultant de la réduction des xanthoprotéides. Si, comme cela a été démontré par plusieurs auteurs, c'est la tyrosine qui joue le rôle essentiel dans la nitration aussi bien que dans la copulation des protéides (avec un diazo) les deux produits de réduction doivent manifester une spécificité sérologique semblable.

Ayant constaté, au cours de tous les travaux précédents que le groupement chimique joue un rôle primordial dans le problème de la spécificité des antigènes, et que la région la plus active de la molécule protéique est principalement le cycle de la tyrosine, nous avons remplacé, dans nos antigènes artificiels, les protéides du sérum par la l-tyrosine pure.

Nous avons d'abord étudié sérologiquement la dinitro-3-5-tyrosine. (On sait qu'OSWALD avait isolé la diiodo-3-5-tyrosine dans le traitement des protéides par l'iode.) Nous avons recherché si cette substance a un certain pouvoir antigénique et si on peut observer des réactions immunologiques croisées entre les xanthoprotéides et les nitrotyrosines.

Nous avons poursuivi ces travaux sur les antigènes à base de tyrosine en préparant les produits de copulation de la tyrosine avec les sels de diazonium analogues à ceux qui entraient dans la constitution des azoprotéides. Les composés obtenus peuvent s'appeler azotyrosines. Nous avons utilisé ces corps, non seulement comme « haptènes précipitants » ainsi que l'avait fait LANDSTEINER en utilisant le produit de copulation de cette même tyrosine avec le sel de diazonium de l'acide suberanilique, mais comme antigènes au vrai sens du mot, capables de susciter *in vivo* la formation d'anticorps spécifiques.

Ayant obtenu, en poursuivant l'étude allergique de tous nos

composés, des phénomènes de réactivité locale cutanée très caractéristiques, nous nous sommes attachée à l'étude histologique du problème en utilisant, suivant les conseils de M. le Professeur PEYRON, la méthode de coloration vitale au trypan bleu.

Désirant suivre le comportement de nos azoprotéides ou azotyrosines dans l'organisme, nous avons étudié les produits qui sont éliminés dans l'urine, pendant les quelques heures qui suivent l'injection de ces antigènes. C'est ainsi que nous avons tenté de mettre en évidence la formation *in vivo*, par coupure de la molécule, de substances aminées faciles à déceler puisqu'elles sont à nouveau diazotables. Nous basant sur les récents travaux de M. et Mme J. TREFOUEL qui ont traité à la vitesse de réduction des matières colorantes azoïques, nous avons recherché, en réalisant des conditions possibles *in vivo* (emploi de la cystéine comme réducteur), si nos azocomposés étaient rapidement réductibles *in vitro*.

A la faveur de nos études sur les azoprotéides arsaniliques, qui contiennent un élément facile à identifier : l'arsenic, nous avons essayé de donner une notion sur la nature chimique des anticorps. On avait émis en effet, depuis BÜCHNER, l'opinion que l'antigène est utilisé pour l'élaboration de l'anticorps. Pour vérifier cette hypothèse intéressante, nous avons essayé de déceler l'arsenic dans l'immunsérum d'animaux traités par plusieurs inoculations d'antigène à base d'arsenic, comme l'avaient fait précédemment quelques auteurs (HOOKER et BOYD, WOLLMAN et BARDACH, DOERR et FRIEDLI, BERGER et ERLENMEYER).

CHAPITRE PREMIER

Préparation des antigènes.

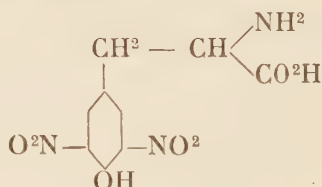
Nos premières recherches ont consisté à mettre au point la préparation, assez délicate des antigènes que nous désirions utiliser : antigènes proprements dits, à base de sérum de cheval et, antigènes dans lesquels nous avons remplacé le sérum par de la l-tyrosine pure.

I

Suivant le traitement chimique que nous avons fait subir au sérum, nous avons obtenu : des xanthoprotéides, des azoprotéides, des aminoprotéides.

Préparation des xanthoprotéides. — Le principe de la préparation consiste à fixer des groupements nitrés sur la molécule protéique.

BAUER et STRAUSS ont montré que la nitration des protéides comportait une substitution dans les cycles de la tyrosine en ortho par rapport à l'hydroxyle. On obtiendrait donc :



Nous avons utilisé la méthode proposée par LANDSTEINER et PRASEK.

Pour 30 cm³ de sérum de cheval, on emploie 180 cm³ d'acide nitrique 10,5 N. On opère dans un ballon à trois

tubulures. On verse le sérum ; on refroidit la solution avec de la glace de façon à maintenir la température au-dessous de 5° et on ajoute l'acide nitrique goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome, en brassant constamment la solution avec un agitateur électrique. Au moment de la nitration, la solution devient orangée. On laisse la température remonter doucement à la normale ; on verse alors la solution dans un litre d'eau glacée et on laisse déposer pendant une nuit à la glacière.

On recueille le précipité jaune de xanthoprotéide après décantation et centrifugation. Après lavage à l'eau physiologique, on redissout le précipité dans une liqueur faiblement alcaline. On peut précipiter de nouveau le protéide nitré par un acide quelconque (HCl 5N). On passe alors sur un filtre BÜCHNER et on lave à l'alcool absolu puis à l'éther sulfurique et on sèche sous la cloche à vide. On obtient alors une poudre jaune-orangé, facile à conserver. Mais il est ensuite très difficile de la redissoudre même en milieu très alcalin.

Nous avons donc jugé préférable de ne pas sécher le culot de centrifugation mais de le redissoudre aussitôt dans une liqueur carbonatée. Nous obtenons alors une solution orangée qu'il suffit de neutraliser en l'amenant à un pH compris entre 6,9 et 7,3. Nous diluons alors cette solution d'antigène : à 2 % si nous voulons l'utiliser pour immuniser les animaux, à 1 % ou 1/200 s'il s'agit de pratiquer un essai de sensibilisation anaphylactique. Pour opérer cette dilution sans peser le précipité, nous nous sommes rapportée à la quantité de sérum utilisé. Etant donné qu'un litre de sérum contient 75 gr. de protéides totales, on calcule aisément le volume de solution nécessaire pour réaliser une dilution à 2 % de protéides, par exemple.

Cette solution de xanthoprotéide est mise à la glacière et représente l'antigène prêt à être injecté. Elle doit être utilisée assez rapidement.

Préparations des azoprotéides. — Elle comporte deux phases : l'obtention d'un sel de diazonium, et la copulation de celui-ci avec le sérum.

1° *Diazotation* : nous avons opéré d'après la méthode clas-

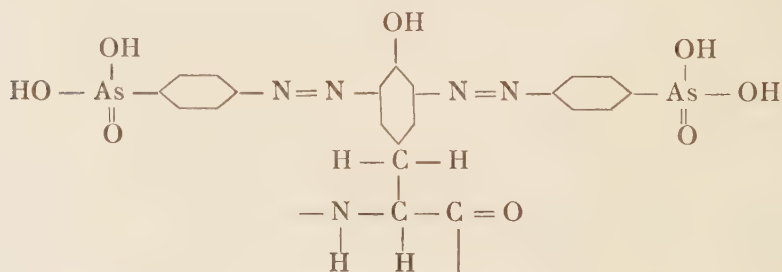
sique en partant d'un acide arylaminé quelconque : acide p-aminophényl-arsinique (arsanilique), acide p-aminophényl-sulfonique (sulfanilique), acide aminobenzoïque. Nous avons d'abord préparé le chlorhydrate de l'acide aminé en employant 2 molécules 1/2 d'acide chlorhydrique *N* pour une molécule d'acide aminé. Puis nous avons traité par une solution *N* de nitrite de sodium en employant un excès (jusqu'à bleuissement du papier iodo-ioduré). Cette opération doit se faire à basse température (entre 0 et 5°). On dilue alors la solution de sel de diazonium dans de l'eau glacée.



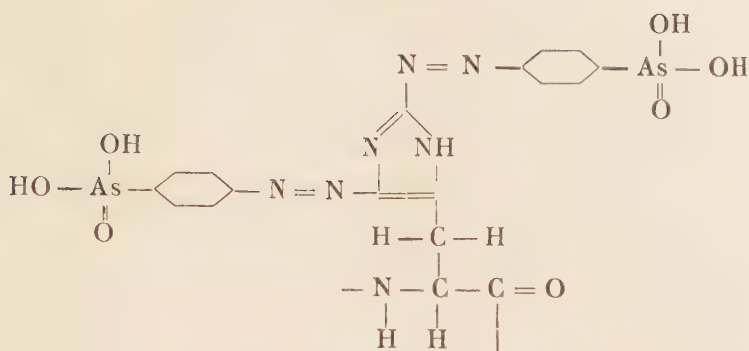
2° *Copulation* : Le sel de diazonium obtenu peut se copuler en milieu alcalin avec tous les phénols en donnant un colorant. Il faut opérer rapidement pour éviter l'isomérisation du diazo.

PAULY le premier avait décrit cette copulation que LANDSTEINER et ses collaborateurs ont appliquée à l'étude des azo-protéides en remplaçant les phénols par les protéides du sérum.

D'après les expériences de PAULY et INOUE, deux amino-acides participaient électivement à la conjugaison des protéides avec les sels de diazonium : la tyrosine et l'histidine. Ces auteurs ont prouvé en outre que deux sels de diazonium se fixaient sur une molécule de tyrosine en ortho par rapport à l'hydroxyle.



(Présentation des groupes tyrosinediazoarsanilique dans la molécule de protéide, d'après SHERWOOD).



(Présentation des groupes histidinediazoarsanilique dans la molécule de protéide, d'après SHERWOOD).

Pour d'autres auteurs dont BUSCH et BOYD, plusieurs autres aminoacides cycliques (phénylalanine, tryptophane, proline, hydroxyproline) seraient capables de se condenser avec les sels de diazonium. EAGLE et VICKERS ont même calculé qu'une molécule de protéide peut immobiliser, après trois heures de contact, environ 400 molécules d'acide sulfanilique.

Pour effectuer la copulation, nous avons employé le sérum mélangé à une solution de carbonate de sodium (50 cm³ de CO³Na² N pour 250 cm³ de sérum), en opérant dans la glace pour éviter toute élévation de température préjudiciable. Cette solution alcaline était versée dans un ballon à trois tubulures (comme pour la nitration) et on ajoutait goutte à goutte la solution de diazo, en agitant constamment et en maintenant la température au-dessous de 5°. Il est indispensable de vérifier de temps en temps que le milieu reste bien alcalin, et d'ajouter un certain volume de carbonate (25 cm³) à la solution de diazo.

On est averti du début de la copulation lorsqu'apparaît brusquement une coloration qui varie entre le rouge et le brun suivant l'acide arylaminé dont on est parti.

Nous avons ensuite précipité les azoprotéides obtenus, par l'acide chlorhydrique en présence de rouge Congo. Pour séparer facilement le précipité, nous avons centrifugé la solution, puis lavé et redissout le culot en milieu faiblement alcalin.

On peut obtenir les azoprotéides en poudre en séchant le précipité après lavage à l'alcool, puis à l'éther sulfurique, mais,

comme dans le cas des xanthoprotéides, on a de grandes difficultés pour redissoudre la poudre et obtenir une solution d'antigène. Il est donc préférable de conserver les azoprotéides en solution après neutralisation et dilution convenable. On a intérêt, pour faciliter la conservation de l'antigène, à ajouter quelques centimètres cubes d'une solution antiseptique (toluène) sauf si on a affaire à un azoprotéide arsanilique.

Dans le cas des xanthoprotéides comme dans celui-ci, il convient de préparer des antigènes tests en faisant varier l'espèce du sérum. C'est ainsi que nous avons obtenu, tour à tour, des xanthoprotéides et des azoprotéides de lapin, de poule, de chat, de chien, de mouton, de porc, de bœuf, de singe.

Dans la préparation des azoprotéides, il est important d'éviter un excès de réactifs, sinon la grande proportion de sels minéraux gêne ensuite la dissolution du précipité (phénomène de relarguage), ce qui nécessite alors une dialyse de la solution. Cette dialyse s'effectue dans des sacs de collodion sulfurique, d'abord contre l'eau courante pendant vingt-quatre heures puis contre l'eau distillée pendant vingt-quatre heures.

Préparation des aminoprotéides. — Nous n'avons trouvé dans la littérature aucun travail se rapportant à la préparation de ces composés. Nous avons donc été obligée de pratiquer plusieurs essais successifs avant de fixer la meilleure méthode de réduction.

Il était impossible d'opérer à chaud ni en milieu acide puisque, dans ces conditions, les protéides sont altérés et précipitent. Tous les procédés basés sur l'action de l'acide chlorhydrique sur un métal (fer, zinc) étaient donc à éliminer.

Nous nous sommes arrêtée à la méthode de réduction par l'hydrosulfite de sodium à froid et en milieu légèrement alcalin, qui nous a donné de bons résultats aussi bien pour la réduction des xanthoprotéides que pour celle des azoprotéides.

1° *Réduction des xanthoprotéides* : pour transformer les groupements NO^2 fixés sur les noyaux cycliques en NH^2 , il fallait mettre en œuvre 3 molécules d'hydrogène par groupe

nitré, soit 6 H^2 pour une molécule de tyrosine. Or la réaction de l'hydrosulfite de sodium, nous fournit 2 H^2 :

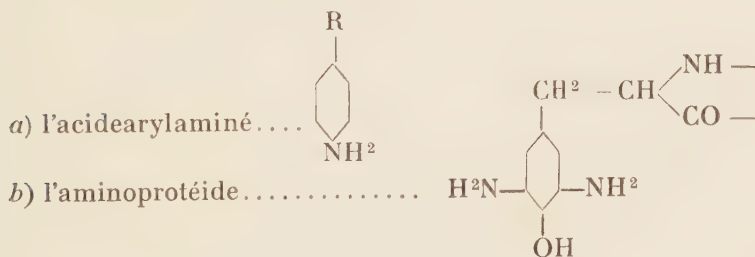


Il est donc nécessaire d'employer 3 molécules d'hydrosulfite pour une molécule de tyrosine, théoriquement. Mais, pratiquement, nous avons employé un grand excès d'hydrosulfite.

Nous avons mélangé la solution de xanthoprotéide légèrement alcaline avec une solution aqueuse d'hydrosulfite de sodium et nous avons laissé la réduction s'opérer en agitant et en maintenant le milieu à basse température comme précédemment. La solution se décolore complètement. Nous précipitons alors les aminoprotéides en milieu acide (CH^3CO^2H). Après centrifugation, nous avons dissout le culot dans une solution de carbonate de sodium dilué. Pour purifier les aminoprotéides, nous les avons précipités à nouveau en milieu acide et redissouts une dernière fois dans une solution faiblement alcaline. Nous avons alors neutralisé exactement le milieu et après une dilution convenable, nous avons conservé la solution à l'abri de l'air car ces composés sont très oxydables. En poudre, les aminoprotéides sont très insolubles et s'altèrent très vite en noircissant.

2) *Réduction des azoprotéides.* — En partant des azoprotéides, nous avons essayé de réduire le groupement $N = N$ avec formation de 2 NH^2 . La coupure de cette double liaison est facile à opérer et nécessite 2 H^2 c'est-à-dire une molécule d'hydrosulfite pour une molécule d'azoprotéide. Ici encore, nous avons employé un grand excès. La technique est la même que pour la réduction des xanthoprotéides.

Nous obtenons ici deux produits aminés différents :



Le premier est normalement soluble en milieu acide chlorhydrique (en donnant un chlorhydrate). C'est la raison pour laquelle il est indiqué de précipiter la seconde fois les aminoprotéides par l'acide chlorhydrique (5 N). Pour la première précipitation, l'acide acétique est préférable pour éviter toute précipitation de soufre. La solution finale était colloïdale et de la couleur du sérum, comme en partant des xanthoprotéides. On a opéré la même dilution.

Nous avons préparé une série de solutions témoins à partir de xantho et d'azoprotéides d'espèces variées.

II

En remplaçant le sérum de la l-tyrosine pure (Hofman-Laroche), dans nos préparations d'antigènes, nous avons constitué deux sortes de composés chimiquement définis : la dinitro-3,5-tyrosine et les azotyrosines.

Préparation de la dinitro-3,5-tyrosine. — Nous avons suivi la technique indiquée par JOHNSON et KOHMANN en 1915.

A 22 gr. d'acide sulfurique concentré, on ajoute 3 gr. d'acide nitrique cc et on refroidit ce mélange à 10°. On fait tomber, alors, 2 gr. de tyrosine finement pulvérisée, par petites quantités, et en agitant constamment. On maintient à une température basse à l'aide de glace pilée. On verse ensuite cette mixture brune dans de l'eau distillée jusqu'à dissolution complète.

Pour éliminer l'acide sulfurique, on le précipite sous forme de sulfate de baryum. On filtre et on ajoute à la solution quelques centimètres cubes d'ammoniaque. On obtient alors une solution rouge brique, contenant le sel d'ammonium de la dinitrotyrosine. On isole ce sel en évaporant la solution à sec, en chauffant à 60° sous pression réduite.

Le résidu sec est repris par 25 cm³ d'eau distillée froide. On ajoute un peu d'acide chlorhydrique pour neutraliser l'ammoniaque. On porte alors à l'ébullition pour dissoudre la dinitrotyrosine. On filtre et on peut clarifier la solution sur du noir animal. Il suffit de refroidir doucement pour obtenir la cristallisation en paillettes jaune d'or de la dinitro-3,5-tyrosine.

Le rendement est d'environ 50 %. Il est préférable d'opérer

sur des portions de 2 gr. de tyrosine et de mélanger les solutions aqueuses seulement après la nitration. Cette dinitrotyrosine perd son eau de cristallisation à 140°-150°. A 220°-230°, elle se décompose avec effervescence sans fondre.

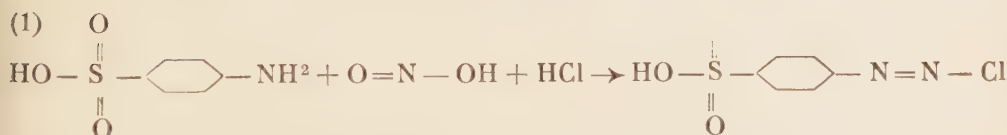
Pour obtenir une solution pouvant servir aux inoculations, il suffit de dissoudre ces cristaux en milieu alcalin et d'amener la solution au *pH* et à la dilution convenables.

Préparation des azotyrosines. — La première opération, consistant à préparer un chlorure de diazonium, est analogue à celle décrite pour les azoprotéides p. 15. On peut faire varier l'acide arylaminé de la même façon.

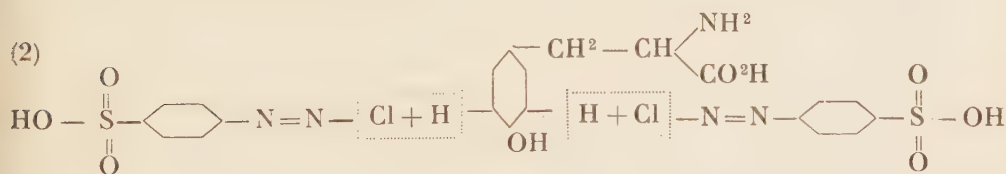
La copulation se produit en présence d'une solution de l-tyrosinate qui remplace le sérum.

PAULY employait 20 millimols d'acide arylaminé, pour 10 millimols de tyrosine (ou d'histidine). Il a reconnu que deux molécules de diazo se fixent en ortho par rapport à l'hydroxyle phénolique, la position para étant occupée.

En partant, par exemple, de l'acide sulfanilique, on obtient d'abord le chlorure de l'acide diazobenzène-p-sulfanilique (1) ;



et, après copulation avec la tyrosine, l'azocomposé (2).



On précipite ces azotyrosines de leur solution par l'alcool absolu et on sèche le colorant en poudre dans le vide sulfurique.

CHAPITRE DEUXIÈME

Avec les antigènes dont nous venons d'indiquer la préparation, nous avons pratiqué sur les animaux des essais d'immunisation ou de sensibilisation.

I

IMMUNISATION DES ANIMAUX

On choisit de préférence le lapin pour l'immunisation. Il est indispensable, bien entendu, de vérifier avant de commencer les inoculations, que le sérum normal de l'animal ne donne aucun précipité avec l'antigène que l'on veut étudier. Il existe en effet chez certains lapins, des anticorps naturels et ceux-ci pourraient être antagonistes des antigènes que nous utilisons.

On commence alors une série d'inoculations par voie intra-veineuse (dans la veine marginale de l'oreille) en utilisant une solution neutre d'un antigène. On peut également opérer par voie intra-péritonéale, mais l'immunité est plus longue à obtenir. Il est cependant nécessaire de recourir à cette méthode, lorsque l'animal commence à être sensibilisé et risque de subir le choc anaphylactique.

Nous injectons généralement 2 à 3 cm³ de notre solution antigénique à 2 %, à raison de deux inoculations par semaine. Après 6 à 10 inoculations, nous prélevons quelques centimètres cubes de sang par ponction cardiaque et nous essayons de mettre en évidence dans le sérum la présence d'anticorps spécifiques, en appliquant la réaction de précipitation antigène-anticorps.

Si la réaction est positive, on recommence avec des dilu-

tions croissantes d'antigène et, si le titre de l'immunsérum est suffisant, on suspend les inoculations. Dans le cas contraire (il faut tenir compte des variations individuelles), on pratique encore quelques injections.

Lorsque le titre de l'immunsérum est suffisamment élevé (NUTTAL donne deux façons de l'exprimer : le volume de précipité formé, ou la plus haute dilution d'antigène avec laquelle l'immunsérum réagit), on saigne le lapin et on recueille stérilement le sérum que l'on conserve en ampoules qui seront utilisées au fur et à mesure des réactions sérologiques.

Pour obtenir un sérum tout à fait clair il est nécessaire de laisser le lapin jeûner pendant 24 heures avant de le sacrifier.

II

SENSIBILISATION DES ANIMAUX

Pour obtenir un état d'hypersensibilité, on s'adresse généralement au cobaye qui est, un bon animal d'expérience. Cette espèce se sensibilise en effet très aisément, et réagit avec une constance remarquable vis-à-vis de l'injection déchainante ; néanmoins, des différences se faisant parfois sentir, il est indispensable d'opérer sur un lot important d'animaux.

Nous avons cependant utilisé le lapin pour les phénomènes de réactivité cutanée (pour lesquels nous avons suivi la technique de SHWARTZMAN), l'inoculation déchainante étant plus facile à pratiquer chez cet animal.

On peut provoquer la sensibilisation par différents procédés :

Une première méthode, indiquée par LANDSTEINER, consiste à préparer l'animal par une seule injection intra-dermique (sur le dos ou l'abdomen) d'une faible quantité d'antigène : 0 cm³ 5 d'une solution à 1/200, par exemple. Au bout d'un mois, on peut chercher à mettre en évidence, la présence de sensibilisine (ou anaphylactine) dans les tissus ou dans la circulation du cobaye, grâce à toutes les réactions allergiques. Si cette unique inoculation n'a pas suffi à sensibiliser le cobaye, il est indiqué d'attendre encore trois semaines après

la constatation des résultats, pour faire une nouvelle inoculation intra-dermique.

LANDSTEINER et JACOBS ont appliqué une autre méthode dans leurs essais de sensibilisation à l'aide de composés chimiquement définis. Elle consiste à inoculer pendant 10 jours de suite, dans l'épaisseur du derme du cobaye, 0 cm³ 1 d'une solution à 1 % du produit à examiner. On suspend les injections pendant 20 jours. La sensibilisation doit alors s'être établie. L'état d'hypersensibilité peut persister pendant plusieurs mois.

La sensibilisation peut encore être conférée à un animal neuf avec des anticorps fabriqués par un autre animal anaphylactisé activement. Pratiquement, on l'obtient en inoculant au cobaye par voie intra-péritonéale, un petit volume de sérum de lapin immunisé (0 cm³ 5, par exemple). L'anaphylaxie passive s'établit d'emblée. Elle a été réalisée tout d'abord en 1907, par NICOLLE, GAY et SOUTHARD. Elle est spécifique comme est l'anticorps qui l'engendre et c'est pourquoi l'étude de l'anaphylaxie peut utilement contribuer à l'étude de la spécificité des anticorps, comme le dit BORDET dans son *Traité de l'Immunité*.

Il est possible de prévenir la réaction déchainante anaphylactique, chez les animaux sensibilisés, par une injection préalable de l'haptène correspondant.

CHAPITRE TROISIÈME

Immuno-réactions.

Nous avons pratiqué des immuno-réactions *in vitro* et *in vivo*.

I

EXPÉRIENCES IN VITRO

Ce sont des réactions biochimiques. Elles consistent à mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques dans l'immunsérum.

A. — SÉRUM NON CHAUFFÉ.

Réaction de précipitation. — Depuis les travaux de KRAUS (1897), c'est la réaction la plus employée parce que très simple et très rigoureuse. Elle se produit entre la précipitine de l'immunsérum et le précipitogène de l'antigène. Dans la précipitation, les particules influencées par le sérum sont extrêmement petites, si fines souvent qu'elles ne communiquent au liquide aucune opacité perceptible à l'œil nu.

Technique. — On utilise l'antigène à des dilutions croissantes de 1 % à 1/100.000 et au delà si possible. On prélève 0 cm³ 2, de chaque dilution, que l'on introduit dans un tube très propre et sec et on ajoute II ou III gouttes d'immunsérum dans chaque tube. On agite et on laisse en contact.

NUTTAL considérait que le rapport de l'antisérum à l'antigène devait être de 20 à 200 au plus.

On lit le résultat :

a) après deux heures au laboratoire ;

b) après une nuit ou vingt-quatre heures de séjour à la glacière.

On obtient un précipité plus ou moins abondant. Pour indiquer le degré d'intensité de la précipitation nous avons employé la notation suivante :

0, f. tr. (faibles traces), tr. (traces),
±, +, + ±, ++, ++ ±, +++, etc.

Si le précipité est trop fin pour être observé à l'œil nu, on emploie un « agglutinoscope » qui permet, en plus du grossissement, de comparer simultanément deux tubes. Il est indispensable de composer des tubes témoins en remplaçant par de l'eau physiologique : d'une part le sérum et d'autre part l'antigène.

On peut également tenter de faire des réactions croisées, en variant les sérums et en remplaçant l'antigène par des substances de constitution voisine.

Réaction d'inhibition. Cette réaction a été découverte par LANDSTEINER et HALBAN, en 1902.

La précipitation, disent-ils, est diminuée ou prévenue, lorsque l'antigène est présent en excès : un composé soluble se formant, contenant, par rapport aux anticorps, une plus grande proportion d'antigène que celle contenue dans les précipités.

Cette même « suppression du phénomène » se produit lorsqu'on remplace l'excès d'antigène par l'addition d'haptènes de constitution très voisine de l'antigène.

Cette réaction d'inhibition est plus sensible pour révéler la diversité sérologique de composés chimiques voisins, que le test de précipitation. Pour déterminer le volume de solution d'haptène (ou d'antigène) capable de provoquer l'inhibition, on doit faire plusieurs essais. Les auteurs, qui ont pratiqué cette réaction, ont employé des proportions d'haptènes, très variables suivant les substances en jeu.

LANDSTEINER et VAN DER SCHEER étudiant les acides tartriques isomères, mettent en présence 0 cm³ 2 d'antigène à une dilution susceptible de donner encore une forte précipitation, 0 cm³ 05 d'une solution neutre contenant 1 millimol-gramme

d'haptène dans 10 cm³, et IV gouttes d'immunsérum correspondant.

Dans leur étude des acides paranitro et paraamino-tartramiques, les proportions d'haptènes à ajouter étaient plus faibles : 0 cm³ 05 d'une solution neutre contenant 0,25 millimol. dans 10 cm³.

ERLENMEYER et BERGER dans leur étude sur les dérivés du pyrazolone utilisent également la réaction d'inhibition. Leur solution d'haptène est obtenue avec 0 gr. 2 % d'une solution à 1 % de NaCl. Pour 0 cm³ 1 de la solution d'antigène à 1/50, ils emploient 0 cm³ 9 de la solution d'haptène et 0 cm³ 15 d'antisérum.

Entre la précipitation et l'inhibition, on constate un phénomène de zone, caractérisé par le fait qu'un excès d'un des facteurs réagissant peut réduire ou même supprimer la quantité de floculat.

Il y a donc dans la réaction antigène-anticorps, une zone de floculation optima correspondant aux meilleures proportions des deux agents en cause.

Réaction d'Uhlenhuth. — On sait que cette réaction, découverte en 1901, permet de reconnaître très rapidement et avec une grande précision, à quelle espèce animale appartient un sang quelconque. Il suffit de verser dans un tube de petit calibre, 0 cm³ 5 d'un antigène déterminé et de faire couler lentement, le long de la paroi du tube, 0 cm³ 2 de l'immunsérum correspondant. On observe la formation d'un anneau blanchâtre à la limite de séparation des deux solutions.

Dans le cas des recherches médico-légales, on met le sérum ou l'extrait de sang suspect en présence de plusieurs immunsérums de lapins (sensibilisés avec des protéides d'espèces différentes).

B. — SÉRUM CHAUFFÉ.

Réaction de fixation du complément. — Cette importante réaction que nous devons à BORDET-GENGOU est basée sur le fait suivant :

Si on mélange un antigène, un anticorps (immunsérum), privé de son complément par chauffage à 56°, pendant trente

minutes, un sérum actif (possédant le complément), et des globules rouges de mouton sensibilisés par un sérum hémolytique anti mouton chauffé, deux faits peuvent se produire :

a) l'anticorps correspond à l'antigène ; le complément se fixe alors sur le complexe antigène-anticorps et les globules rouges ne sont pas hémolysés ;

b) l'anticorps ne correspond pas à l'antigène ; le complément libre se fixe sur les globules sensibilisés, ce qui se traduit par une hémolyse.

Comme la précipitation spécifique, la fixation du complément présente le phénomène de zone. Elle ne se produit que lorsque les proportions respectives de l'antigène et de l'anticorps sont comprises entre certaines limites. On peut se demander si ces deux phénomènes évoluent séparément ou s'ils sont liés l'un à l'autre. La question est vivement débattue et les auteurs ne sont pas d'accord.

Dans la pratique, il faut d'abord s'assurer que l'antigène n'est pas anti-complémentaire et pour cela titrer cet antigène en utilisant des dilutions variables, par exemple : 1/100, 1/200, 1/500, 1/800, 1/1.000... On prélève 0 cm³ 2 de chaque dilution et on ajoute 0 cm³ 1 de complément (sérum titré de cobaye). Après avoir amené la solution à 2 cm³ avec de l'eau physiologique, on ajoute 0 cm³ 5 de globules rouges de mouton sensibilisés. On porte tous les tubes à l'étuve à 37° où on les laisse pendant une heure. On lit alors le résultat. On note le premier tube dans lequel se produit l'hémolyse, car c'est à cette dilution-limite que l'on emploiera l'antigène pour les réactions ultérieures.

Pour la réaction de fixation du complément, nous avons employé les proportions suivantes de réactifs : 0 cm³ 2 d'antigène titré, 0 cm³ 2 d'immunsérum chauffé préalablement au bain-marie à 56° pendant une demi-heure, 0 cm³ 1 de complément titré. On amène la solution à 2 cm³ (eau physiologique) et on laisse pendant une heure à l'étuve à 37°. On ajoute alors 0 cm³ 5 de globules sensibilisés et on replace à l'étuve pour une demi-heure. On lit alors le résultat. Il est indispensable de faire des tubes témoins pour chaque réactif. La présence d'une sensibilisatrice spécifique, dans l'immunsérum, se manifeste par l'absence d'hémolyse.

II

EXPÉRIENCES « IN VIVO »

Ce sont des réactions biologiques qui permettent de mettre en évidence l'état allergique. La plupart sont dites anaphylactiques.

Après avoir pratiqué l'un des différents modes de sensibilisation que nous avons décrits, on déclenche, chez les animaux ainsi sensibilisés, des symptômes locaux et généraux.

Intra-dermo-réaction. — Cette réaction présente de grandes analogies avec le phénomène classique d'ARTHUS. Cet auteur avait observé que plusieurs inoculations répétées de sérum de cheval, dans l'épaisseur du derme du cobaye, provoquaient une induration locale suivie d'une escarre.

Dans nos expériences, nous avons provoqué, chez l'animal sensibilisé par une substance protéique ou même simplement par certains corps chimiques, une réaction locale caractéristique en inoculant dans la peau, au même point, le même composé.

La zone de nécrose provoquée s'est montrée plus ou moins étendue suivant l'activité du produit sensibilisant. Dans certains cas, l'escarre produite peut être volumineuse.

Lorsque l'on opère sur un lot de cobayes, tous sensibilisés au même composé, il est intéressant de varier le produit de l'injection déchainante et d'étudier le rapport entre sa constitution et les caractères de l'escarre produite. Il est indispensable de s'assurer que ces substances ne produisent aucune inflammation apparente chez des cobayes neufs.

Cette méthode est très employée actuellement pour étudier le pouvoir sensibilisant de certains composés chimiques et pour définir le groupe spécifique qui apparente certaines substances entre elles.

Choc anaphylactique. — RICHET et PORTIER découvrirent ce curieux phénomène en 1902 et lui attribuèrent le nom d'anaphylaxie. ROSENAU et ANDERSON établirent en 1907, la stricte spécificité de cette réaction.

Si on pratique sur des animaux sensibilisés, une injection dite « déchainante », non plus par piqûre, dans l'épaisseur du derme, comme dans la réaction précédente, mais par voie intra-veineuse, on voit apparaître des troubles graves et souvent mortels qui constituent le « choc anaphylactique ». Chez le cobaye, ce phénomène se manifeste par de l'agitation, des convulsions, de la paralysie respiratoire souvent suivies de mort. Chez le lapin, la phase d'excitation est plus courte et la phase de paralysie plus longue.

Ce choc s'expliquerait par la formation d'un complexe entre la sensibilisine (anticorps anaphylactique) et le sensibiligène introduit dans la circulation.

L'injection déchainante se pratique, chez le cobaye, soit dans les veines saphène ou jugulaire, soit dans le cœur. On peut opérer également par voie intra-péritonéale : la sensibilité de la réaction est moins grande, mais on évite la mort par embolie.

Un animal ayant subi la sensibilisation passive par un immunsérum, peut présenter le phénomène de choc anaphylactique dès le lendemain si on lui inocule l'antigène correspondant.

D'après FIERZ, JADASSOHN et STOLL, on pourrait sensibiliser ou déclencher la réponse anaphylactique, sans utiliser un protéide hétérologue. La substance chimique en cause se couplerait, *in vivo*, avec les protéides de l'organisme et l'antigène obtenu réagirait.

Les récents travaux de LANDSTEINER ont prouvé qu'il est possible de provoquer le choc anaphylactique chez des cobayes sensibilisés avec des azoprotéides, par simple injection d'azocomposés chimiquement définis, et contenant simplement le même groupe spécifique. Il était pourtant impossible ici d'envisager l'intervention des protéides de l'organisme, ces composés étant stables.

Réaction de Schultz-Dale. — En 1910, SCHULTZ a observé que les muscles lisses (intestin) des animaux sensibilisés se contractent, *in vitro*, au contact de l'antigène qui a servi à la sensibilisation. Ce fait a servi d'argument à la théorie cellulaire de fixation des anticorps.

DALE poursuivit l'étude de ce phénomène en 1913, et trouva qu'on pouvait utiliser pour ces recherches l'utérus des cobayes. Il imagina un appareil qui permet de réaliser aisément la réaction et qui comprend : 4 récipients destinés à contenir une solution physiologique de Tyrode à 37° (nous avons, au cours de nos expériences, obtenu de meilleurs résultats en employant la solution décrite par WEBSTER :

NaCl 9 ; KCl 0,2 ; CaCl² 0,2 ; MgCl² 0,1 ; eau q. s. 1.000).

Ces 4 vases plongent dans un thermostat maintenu à 37°. Une arrivée d'oxygène est ménagée dans chaque bain physiolo-

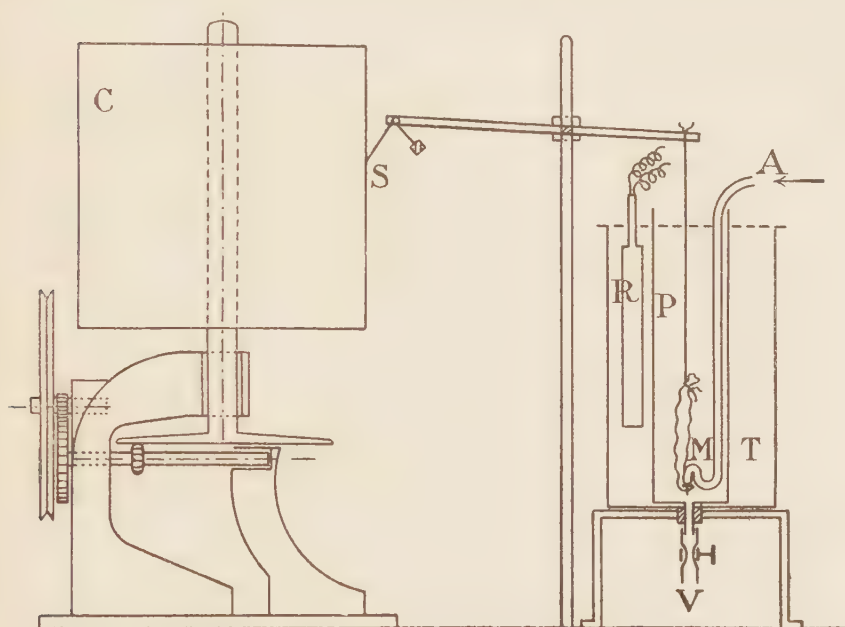


FIG. 1. — Schéma de l'appareil de Schultz-Dale.

A arrivée de l'oxygène.
T thermostat.
R résistance.
M fragment musculaire.

P solution physiologique.
V vidange de la solution physiol.
C cylindre enregistreur.
S stylet inscripteur.

gique, par un tube de verre portant, à son extrémité, un petit fil de platine servant à accrocher la portion de muscle isolé. L'autre côté du fragment musculaire tendu est relié, par un fil, à un stylet se déplaçant sur un cylindre mû par un mouvement d'horlogerie. Un dispositif permet de renouveler la solution physiologique de chaque vase et de laver le muscle

après réaction, afin de l'utiliser tant qu'il conserve ses contractions normales (quelques heures) (fig. 1 et fig. 2, pl. I).

Pour pratiquer la réaction, il suffit d'ajouter au bain dans lequel plonge l'intestin sensibilisé, quelques centimètres cubes de la solution d'antigène préalablement utilisé pour la sensibilisation. On voit alors la courbe de contraction s'élever brusquement. Dès que la neutralisation antigène-anticorps s'est produite, la courbe redescend et le muscle, après lavage, réagit moins fortement à une nouvelle addition d'antigène dans le bain.

Il est indispensable d'opérer des essais sur des intestins de cobayes normaux avant de noter les résultats. L'addition des solutions d'antigènes-tests ne doit apporter ici aucune modification à la courbe des contractions. Pour étudier la spécificité, on peut utiliser, sur quatre portions du même intestin, plusieurs antigènes différents.

Nous avons employé, à l'exemple de SCHULTZ, des fragments d'intestin grêle de même longueur (2 à 3 cm), prélevés au niveau du gros intestin.

Nos meilleurs résultats ont été obtenus en ajoutant dans le bain 2 cm³ de la solution d'antigène à la dilution employée pour la sensibilisation.

Réaction de Prausnitz-Kustner. Cette réaction, découverte en 1921, permet de réaliser, *in vivo*, une précipitation antigène-anticorps qui se traduit par une inflammation locale. Elle ne demande pas une sensibilisation préalable des animaux. Il suffit de posséder un immunsérum frais provenant de n'importe quel animal (lapin). On inocule alors aux cobayes, par voie intra-dermique, un volume variant de 0 cm³ 2 à 0 cm³ 5 de ce sérum riche en anticorps, et, au bout de vingt-quatre heures, on injecte au même point, 0 cm³ 5 à 1 cm³ de la solution d'antigène correspondant. Il se produit une réaction locale se traduisant par une nécrose rappelant celle due au phénomène d'ARTHUS, et plus ou moins importante suivant les proportions d'allergène et d'allergine en action.

Il est toujours nécessaire de faire des témoins qui ne reçoivent que l'immunsérum ou que la solution d'antigène.

Cette réaction permet de comparer facilement les rapports

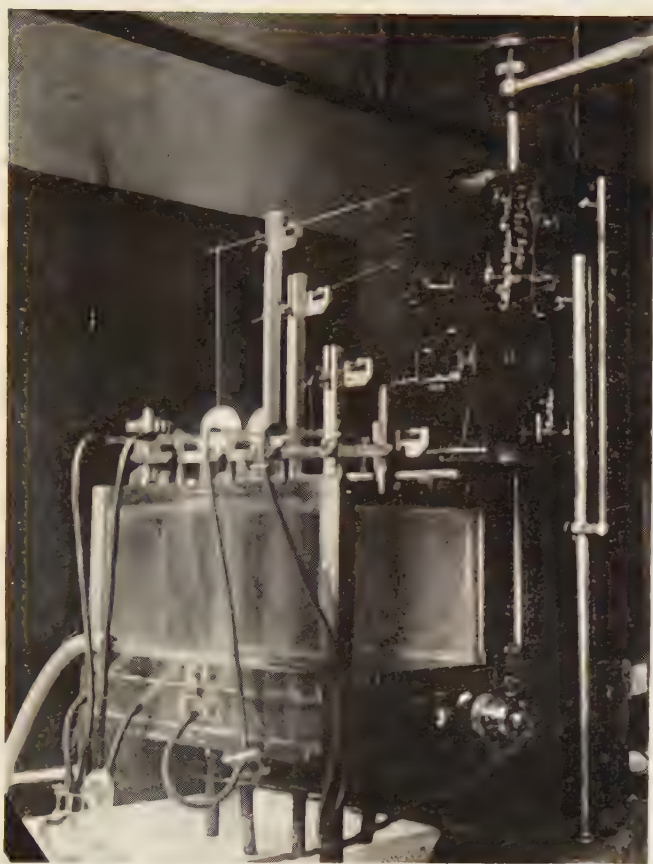


FIG. 2. — Appareil de Schultz-Dale.

(Cliché Armand)

sérologiques existant entre plusieurs antigènes d'apparence très voisins, en traitant un lot de cobayes par le même anti-sérum et, en variant ensuite les antigènes dans la deuxième inoculation.

Phénomène de réactivité locale cutanée. — SANARELLI découvrit, en 1924, le phénomène suivant : en inoculant des vibrions cholériques dans le péritoine des lapins et vingt-quatre heures après, un filtrat microbien quelconque par voie intra-veineuse, cet auteur observa une nécrose viscérale caractéristique.

En 1928, SHWARTZMAN découvrit une réaction non moins intéressante. Cet auteur préparait la peau des lapins par une première inoculation intra-cutanée de filtrat de *Bacterium coli* ou de Bacille d'EBERTH. Au bout de vingt-quatre heures (parfois même au bout de 6 ou 8 h.), il injectait, par voie intra-veineuse, un filtrat microbien quelconque. Il constatait alors, à l'emplacement de la première inoculation, une réaction conjonctive de la peau avec des taches hémorragiques ou une escarre avec zone inflammatoire.

Il nous a paru intéressant d'utiliser le principe de cette réaction, en employant, non plus des antigènes microbiens, mais les antigènes à caractère chimique que nous avons préparés. Nous avons suivi la technique de SHWARTZMAN : une première inoculation intra-cutanée de notre antigène ; au bout de vingt-quatre heures, une deuxième injection dans la veine du lapin (ou du cobaye) de la même solution d'antigène à la même dilution. Au bout de quarante-huit heures, si la réaction est positive, on voit apparaître, au point de la première inoculation (ou dans une zone voisine représentant un *locus minoris resistentiae*), une escarre plus ou moins étendue entourée d'une zone inflammatoire avec nécrose hémorragique.

Cette réaction ne ressemble à aucune autre manifestation de l'anaphylaxie. Elle se classe tout à fait à part. SHWARTZMAN n'a observé aucune relation spécifique entre les inoculations « préparante » et « déchainante », mais il faut noter qu'il opérait sur des filtrats microbiens qui possèdent une constitution très complexe.

CHAPITRE QUATRIÈME

Résultats.

Après la description de la préparation des antigènes et des modes d'immunisation des animaux, nous apportons ici les résultats obtenus au cours d'expériences que nous avons pour chaque cas, renouvelées plusieurs fois.

I

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES XANTHOPROTÉIDES (1)

Des inoculations répétées, aux lapins, de notre solution de xanthoprotéides à 2 %, nous ont donné un immunsérum spécifique. Pour étudier les propriétés des anticorps présents dans ce sérum, nous avons utilisé, *in vitro*, les réactions décrites au chapitre précédent.

Réaction de précipitation. — Le titre de notre immunsérum était assez élevé puisque nous avons noté une précipitation en présence de l'antigène dilué à 1/100.000. Nous avons comparé la réaction en présence de l'antigène correspondant et en présence d'antigènes tests préparés à partir de protéides hétérologues. Dans tous ces cas, nous avons observé un précipité à grains assez gros, se détachant très nettement dans la solution claire. L'intensité de la réaction de précipitation

1. Nous désignerons dans les tableaux suivants :

les xanthoprotéides par **X P** ;

les azoprotéides par **Az P** ;

les aminoprotéides par **Am P**.

n'est pas en rapport avec l'espèce du sérum qui a servi à l'immunisation comme on peut le constater dans le tableau suivant qui résume tous les résultats que nous avons obtenus.

L'immunsérum provient de lapins ayant subi de 6 à 8 inoculations de xanthoprotéide de cheval. Les proportions de réactifs employées étaient : 0 cm³ 2 d'antigène aux diverses dilutions mentionnées pour 11 gouttes de sérum.

TABEAU 1

Antigènes	Immunserum anti XP de cheval													
XP Cheval....	+	++	+	++	+	++	+	++	±	++	±	++	±	+
XP Lapin.....	++	+++	+	+++	+	+++	±	++	±	++	±	++	±	±
XP Porc.....	±	++	±	++	±	++	±	++	±	++	±	++	tr	+
XP Mouton...	±	±	±	+	±	+	±	+	tr	+	tr	±	tr	±
XP Chat.....	±±	±±	+	++	+	++	+	±±	±	+	±	±	±	+
XP Singe.....	+	++	+	++	+	++	+	++	±	++	±	±±	±	+
AzP Porc.....	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AmP Porc.....	0	f. tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dilut. d'antig.	1		1		1		1		1		1		1	
	100		500		1.000		5.000		10.000		50.000		100.000	

Pour chaque { 1^{re} colonne : lecture après 2 heures au laboratoire.
dilution : { 2^e colonne : lecture après une nuit à la glacière.

Ce tableau montre que le sérum anti-xanthoprotéide ne donne aucune précipitation notable en présence de protéides ayant subi des modifications chimiques différentes tels que les azoprotéides ou les aminoprotéides.

Les xanthoprotéides ont donc acquis un caractère spécifique nouveau qui les apparente tous quel que soit l'origine du sérum et qui est en rapport seulement avec le groupe nitré introduit.

Réaction d'inhibition. — Nous avons vu qu'il était possible d'empêcher la précipitation antigène-anticorps de se produire, soit par addition du même antigène en excès, soit par addition d'une substance de constitution chimique très voisine.

Dans le cas présent, pour observer une inhibition complète, nous avons ajouté au mélange antigène-anticorps (en proportion optima), un volume de 0 cm³ 5 d'une solution de

xanthoprotéide à 1 %. L'espèce ne joue ici encore aucun rôle.

En remplaçant cet excès d'antigène, par une addition de dinitro-3,5-tyrosine ($0\text{ cm}^3\text{ 9}$ d'une solution à 1 %), nous avons également observé la suppression de toute précipitation. WORMALL avait de même obtenu l'inhibition, en travaillant avec les protéides iodés, par addition au mélange antigène-anticorps, de diiodotyrosine.

L'action d'orthonitrophénol ou de dinitrophénol, comme substances d'inhibition, dans les mêmes conditions, a été beaucoup moins spécifique. Nous avons cependant noté, dans ces deux cas, une diminution de l'intensité de la précipitation, par rapport au tube témoin contenant le simple mélange antigène-anticorps.

Réaction d'Uhlenhuth. — En suivant la technique que nous avons décrite, nous avons observé la formation d'un anneau blanc caractéristique en mettant en contact $0\text{ cm}^3\text{ 5}$ d'une solution à 0,005 % de xanthoprotéide et $0\text{ cm}^3\text{ 5}$ d'immunsérum correspondant, quelle que soit l'espèce des protéides en jeu. Nous avons pu noter une légère prédominance de l'espèce ayant servi à l'immunisation, seulement à la forte dilution de 0,002 %.

En présence d'azoprotéides ou d'aminoprotéides, le sérum anti-xanthoprotéides ne donne jamais la réaction d'UHLENHUTH, quelle que soit la concentration de l'antigène test.

Réaction de fixation du complément. — Après avoir titré la solution antigénique de xanthoprotéide et constaté que la dilution limite (non anti-complémentaire) était 1/1.000, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'une sensibilisatrice spécifique dans notre immunsérum, en suivant la technique de BORDET-GENGOU.

En utilisant les proportions suivantes : $0\text{ cm}^3\text{ 2}$ de la solution titrée d'antigène (xanthoprotéides d'espèces variées : cheval, lapin, porc) pour $0\text{ cm}^3\text{ 2}$ d'immunsérum pur et décomplémenté (anti-xanthoprotéide de cheval), nous avons toujours obtenu la fixation du complément. Par contre, la réaction a été négative, lorsque nous avons remplacé notre antigène

nitré par une solution d'azo ou d'aminoprotéide, préalablement titré.

Opérant, d'autre part, *in vivo*, sur des animaux sensibilisés par une ou plusieurs inoculations d'antigène, nous avons tenté de déclencher des réactions biologiques en rapport avec l'état allergique créé.

Intra-dermo-réaction. — Des cobayes sensibilisés au xanthoprotéide de cheval par deux injections intra-dermiques espacées d'un mois, de 0 cm³ 5 chacune (solution à 0,5 %) ont donné une réaction cutanée positive après l'injection déchaînante du même volume de xanthoprotéide, pratiquée en n'importe quel point de la peau (fig. 3, pl. II). La nécrose produite se montra de même importance, quelle que fut l'espèce du xanthoprotéide, utilisée pour l'injection déchaînante.

Des témoins sensibilisés de la même façon, n'ont eu aucune escarre après l'inoculation de divers autres antigènes (sérum pur de cheval, azo, aminoprotéide).

Choc anaphylactique. — Sur un lot de 12 cobayes sensibilisés par 10 injections intra-dermiques de la solution à 0,5 % de xanthoprotéide de cheval, 7 ont subi le choc anaphylactique (mortel pour 4 d'entre eux) aussitôt après l'injection déchaînante intra-veineuse d'une même solution de xanthoprotéide homologue ou hétérologue sans distinction.

En variant cette dernière injection, nous n'avons jamais observé ce phénomène caractéristique, pas même en utilisant le sérum pur homologue, ce qui démontre, une fois de plus, que les xanthoprotéides ont bien perdu tout caractère propre à l'espèce du sérum.

Réaction de Schultz-Dale. — Nous avons opéré sur des fragments d'intestin de cobayes sensibilisés au xanthoprotéide de cheval, et nous avons d'abord inscrit les contractions musculaires normales, en suivant la technique décrite p. 30. Puis nous avons, au cours de diverses expériences, ajouté dans le bain soit :

a) 2 cm³ de la solution à 0,5 % correspondante (xanthoprotéide de cheval). Nous avons constaté aussitôt une forte

ascension de la courbe, qui reprend ensuite rapidement son amplitude normale. Après lavage, ce fragment d'intestin réagit encore à une nouvelle addition du même antigène, mais plus faiblement ; il donne encore une légère élévation

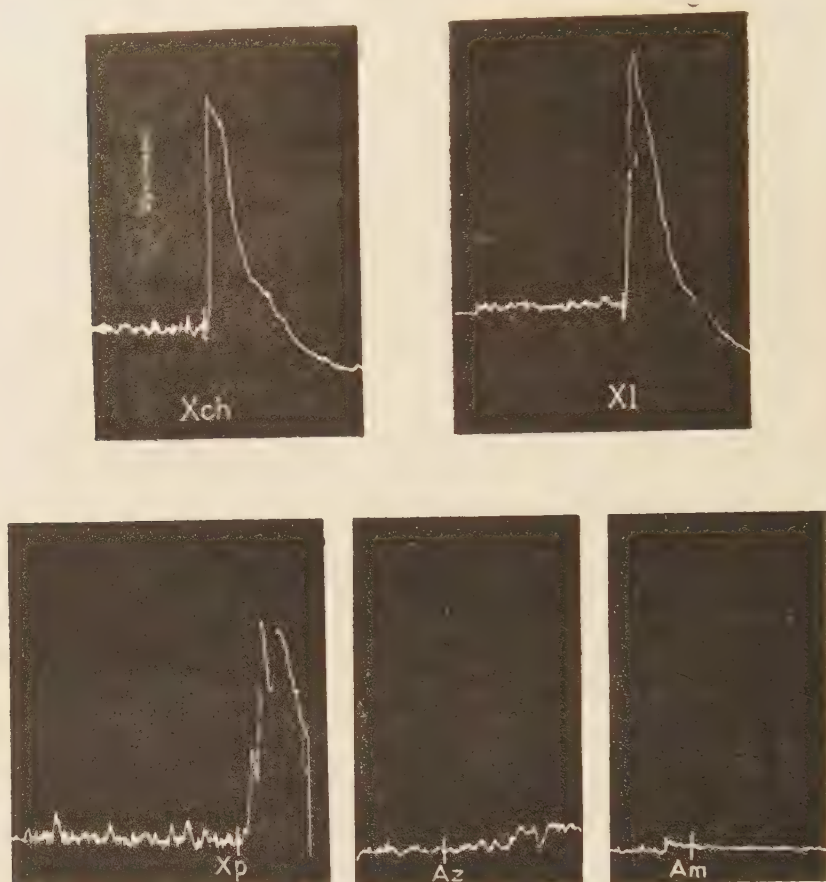


FIG. 4. — Courbe des contractions d'intestin isolé.

■ Cobaye n° 14 sensibilisé au xanthoprotéide de cheval. Chaque addition dans le bain correspond à 2 cc. d'une solution d'antigène test à 0,05 %.

Xch : xanthoprotéide de cheval.
 XI : xanthoprotéide de lapin.
 Xp : xanthoprotéide de porc.
 Az : azoprotéide (poulet).
 Am : aminoprotéide (poulet).

de la courbe jusqu'à neutralisation complète des anticorps.

b) 2 cm³ d'une solution test de xanthoprotéide de lapin, à la même dilution. Nous avons noté une réponse aussi importante que dans le cas précédent.

c) 2 cm³ d'une autre solution test de xanthoprotéide de porc. L'ascension de la courbe se montra en tout point comparable.

d) 2 cm³ d'une solution à 0,5 % d'azoprotéide ou d'aminoprotéide de poulet. Nous n'avons, dans ces deux expériences, observé aucune modification de la courbe des contractions normales (fig. 4).

Une expérience témoin, effectuée avec des fragments d'in-

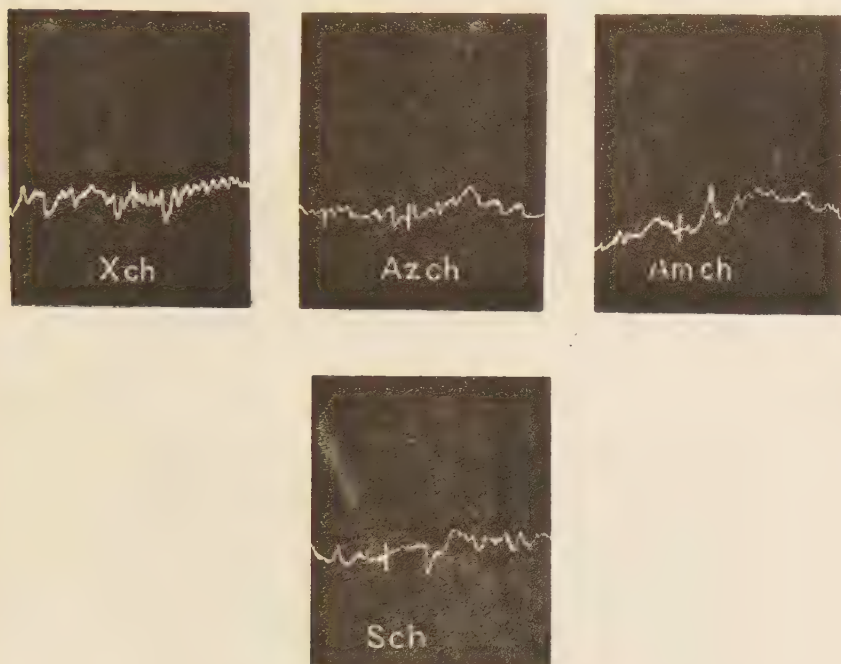


FIG. 5. — Courbe des contractions d'intestin isolé.

Cobaye normal témoin (solution physiologique glucosée). Chaque addition correspond à 2 cc. d'antigène ou haptène.

Xch : xanthoprotéide cheval 0,05 %
Azch : azoprotéide cheval 1 %.
Amch : aminoprotéide cheval 1 %.
Sch : sérum de cheval pur.

testin de cobayes non sensibilisés, a permis de constater que l'addition de xanthoprotéide, dans les mêmes conditions, ne provoquait aucune ascension de la courbe (fig. 5).

Dans une autre série d'essais sur l'intestin de cobayes sensibilisés au même xanthoprotéide, nous avons pu mettre en évidence l'action de simples haptènes, de constitution appa-

remment voisine, tels que le dinitrophénol 2-6 ou la dinitrotyrosine 3-5. L'addition de 2 cm³ d'une solution à 2 % de ces composés déclenchait une forte réponse anaphylactique (fig. 6). Sur des muscles non sensibilisés aux xanthoprotéides, ces solutions nitrées n'ont aucune action stimulante.

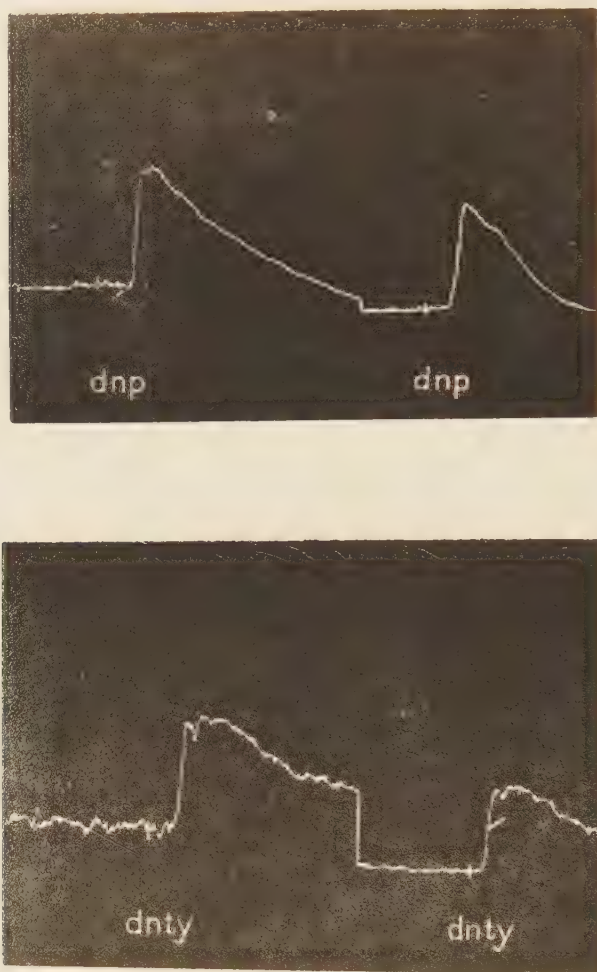


FIG. 6. — Courbe des contractions d'intestin isolé.

Cobaye n° 15 sensibilisé au xanthoprotéide de cheval. Chaque addition dans le bain correspond à 2 cc. d'une solution d'haptène à 1 %. On constate que la 2^e réponse est moins forte (neutralisation partielle des anticorps).

dnp : dinitro phénol 2-6.

dnty : dinitro tyrosine 3-5

Réaction de Prausnitz-Kustner. — Nous avons réussi à provoquer une inflammation cutanée en injectant par voie intradermique au même point et à vingt-quatre heures d'intervalle :
a) 0 cm³ 5 d'immunsérum anti-xanthoprotéide de mouton ;
b) 0 cm³ 3 d'une solution à 1 % de xanthoprotéide homologue ou hétérologue. La zone nécrotique est assez restreinte comme dans les intra-dermo réactions décrites plus haut ; l'escarre subsiste pendant quelques jours mais n'apporte aucun trouble dans l'état général des animaux.

En remplaçant, dans la deuxième inoculation, la solution de xanthoprotéide par l'azo, l'aminoprotéide ou même par un sérum pur quelconque, nous n'avons déclenché aucune escarre.

Phénomène de réactivité locale cutanée. — En utilisant la technique classique décrite par SHWARTZMAN, pour l'étude des xanthoprotéides, nous n'avons pas constaté l'apparition du phénomène cutané caractéristique. Nous avons légèrement modifié la méthode, en effectuant une sensibilisation préalable de l'animal (par 2 ou 3 injections intra-veineuses de notre même antigène). Nous avons alors repris, sur ces animaux, la technique habituelle : une injection intra-dermique préparante suivie vingt-quatre heures après d'une injection intra-veineuse. Nous avons alors provoqué le phénomène inflammatoire aigu classique. Il est indispensable toutefois de suivre la méthode de BESREDKA, pour éviter le choc anaphylactique au cours de la dernière injection déchaînante.

Nous avons observé, en suivant cette technique, des réactions croisées entre les xanthoprotéides de cheval, de bœuf et de mouton ; mais jamais entre des antigènes de composition chimique différente (1).

Ces diverses réactions immunologiques et allergiques prou-

1. Au moment où cet ouvrage est sous presse, nous prenons connaissance de l'article de ALBUS (G.) et FISCHER (Kurt), Ein Beitrag zum Schwartzman-Phänomen. I *Ztschr. f. Immunf.*, 1938, 92, 472. Ces auteurs, utilisant le sérum de cheval comme antigène, obtiennent une réaction nécro-hémorragique plus constante en opérant sur des animaux déjà sensibilisés. Ils observent d'autre part, comme nous, la spécificité de ce phénomène.

vent que les protéides nitrés perdent tout caractère d'espèce. Ils conservent cependant leur pouvoir antigénique mais les anticorps qu'ils suscitent présentent une spécificité nouvelle très marquée en rapport étroit avec les groupements NO^2 introduits dans la molécule de sérum.

Cette étude approfondie des xanthoprotéides, nous a permis de confirmer les premiers travaux dus à OBERMAYER et PICK. Toutes les réactions allergiques tendent à démontrer la disparition du caractère zoologique et, parmi les réactions opérées, *in vitro*, seul le phénomène d'UHLENHUTH, très sensible, nous a permis de croire à une légère persistance du caractère d'espèce.

II

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES AZOPROTÉIDES

Nos premiers travaux ont porté sur un azoprotéide dérivé de l'acide sulfanilique. Nous avons recherché si les caractères d'origine disparaissent totalement après le traitement chimique du sérum, ou s'ils subsistent légèrement, comme il semblait ressortir de certaines expériences dues à LANDSTEINER et à ses collaborateurs.

Nous avons ensuite procédé à la comparaison sérologique des divers azoprotéides dérivés des acides arylaminés suivants : acide sulfanilique, arsanilique et aminobenzoïque (formes ortho, méta, para). L'influence de ces différentes fonctions acides sur la spécificité de l'antigène de base avait été signalée par LANDSTEINER et VAN DER SCHEER qui avaient utilisé pour cette étude, les réactions de précipitation et d'inhibition. Nous avons étendu le champ des réactions biochimiques et nous nous sommes adressée aux propriétés allergisantes de nos antigènes afin de déterminer le groupe spécifique.

Réaction de précipitation. — Les lapins ayant subi 6 à 10 injections intra-veineuses de 2 cm³ d'une solution à 2 % d'azoprotéide sulfanilique, nous ont fourni un immunsérum d'un

titre élevé. La précipitation est encore abondante lorsque l'antigène est dilué à 1/100.000. Les précipitines ne semblent pas en rapport avec l'origine des protéides de l'antigène puisque nous avons obtenu des anticorps en partant d'un azoprotéide de lapin (même groupe que celui du lapin inoculé). Le groupement diazo aurait donc une influence dominante au point de vue de la spécificité. L'espèce pourrait cependant jouer un rôle secondaire puisque nous avons observé une diminution de la précipitation dans l'ordre suivant : azopro-

TABLEAU 2.

Antigènes	I-S anti-azoprotéide sulfanilique de cheval						
AzP Cheval.....	+++	+++	++±	++±	++±	++±	++
AzP Bœuf.....	+++	++±	±±	++	±±	+	+
AzP Mouton.....	+++	+++	++	±±	±±	+	+
AzP Singe.....	+++	+++	++±	±±	+	+	+
AzP Chien.....	++	±	+	+	±	±	±
AzP Chat.....	±±	+	+	+	+	±	±
AzP Poulet.....	+	+	+	+	±	tr	tr
Dilut. d'antigène..	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	$\frac{1}{5.000}$	$\frac{1}{10.000}$	$\frac{1}{50.000}$	$\frac{1}{100.000}$

Lecture après une nuit à la glacière.

téide de cheval, de bœuf, de mouton, de singe, de chien, de chat et de poulet. Ces résultats résumés dans le tableau 2 ont été obtenus en partant d'un mélange de 0 cm³ 2 d'antigène pour 11 gouttes d'immunsérum.

Après avoir ainsi prouvé la prédominance du groupe diazo dans la molécule d'antigène, nous avons effectué des réactions croisées entre les azoprotéides sulfanilique, arsanilique, o, m, et p-aminobenzoïque.

Nous mentionnons dans le tableau 3 l'intensité de la précipitation obtenue en faisant varier soit l'antigène soit l'immunsérum. Nous voyons que cette méthode sérologique permet de différencier très nettement les azoprotéides dérivés d'acides différents.

TABLEAU 3

Antigènes	Immuserum anti-azoprotéide									
	Sulfanil.		Arsanil.		Aminobenzoïque					
					para		méta		ortho	
AzP. sulfanil....	+++	++±	±	0	+	±	0	0	tr.	0
AzP. arsanil....	tr.	0	+++	++	+	tr.	±	f. tr.	+	±
AzP. p-aminob...	±	0	+	±	+++	++	+	tr.	±	0
AzP. o-aminob...	0	0	0	0	+	0	±	0	+++	++
AzP. m-aminob...	±	f. tr.	±	tr.	±	tr.	+++	++±	±	0
XP. (mouton) ...	±	0	+	0	0	0	0	0	0	0
AmP (mouton) ..	0	0	+	0	0	0	±	0	0	0

Dilutions d'antigène { 1^{re} colonne 1/100
2 colonne 1/50.000

Lecture après une nuit à la glacière.

Ces résultats montrent que de très petites modifications sur l'antigène, se répercutent nettement sur l'anticorps. Tous les azoprotéides tests étaient préparés à partir d'un sérum de mouton. (Les immunsérums sont toujours obtenus par inoculations d'azoprotéide de cheval). On évite ainsi toute influence due à l'espèce.

Le tableau précédent montre que la position du radical acide fixé sur le noyau benzoïque, semble avoir plus d'influence que la nature même de cet acide. Il permet de se rendre compte que les azoprotéides dérivés de divers acides para aminés, présentent au point de vue sérologique, une certaine ressemblance. On voit aussi que l'influence déterminante du groupe AsO^3H^2 est très prononcée.

Nous n'avons noté aucune réaction croisée entre azoprotéides et xanthoprotéides. De plus, la précipitation a toujours été très faible entre les immunsérums anti-azoprotéides et les aminoprotéides.

Réaction d'inhibition. — Les résultats de cette réaction nous ont permis de confirmer les conclusions tirées de la réaction de précipitation.

En utilisant, comme substances tests d'inhibition les haptènes correspondants aux antigènes utilisés, c'est-à-dire les acides

arylaninés purs en solution à 1/500, nous avons constaté qu'il ne se produisait plus de précipitation dans le mélange antigène-anticorps.

Nous avons employé la technique suivante : à 0 cm³ 2 de la solution d'antigène à 0,01 %, nous ajoutons 0 cm³ 9 de la solution d'haptène à 0,2 % et nous additionnions ce mélange de II gouttes d'immunsérum correspondant à l'antigène.

Le tableau 4 représente les variations de l'intensité de la précipitation suivant l'haptène employé. Le tube témoin T, ne contient que le mélange antigène-anticorps dans les conditions optima, il donne donc toujours une très forte précipitation.

TABLEAU 4.

Immunsérums de	T	Haptènes utilisés pour l'inhibition				
		ac. sulf.	ac. arsan.	ac. amino benz.		
				p	m	o
AzP sulfanil.....	+++±	0	+++±	++	+	++
AzP arsanil.....	+++	++	tr	+	++	+
AzP aminobenz-p....	+++	+±	++	0	+	±
AzP aminobenz-o....	+++	+++	++±	±	++	0
AzP aminobenz-m....	++±	++	+	+	0	±

Lecture après une nuit à la glacière.

Ainsi, l'inhibition n'est complète que lorsqu'on utilise, comme haptène, l'acide même qui entre dans la constitution de l'azoprotéide immunisant. Par cette méthode, on peut différencier les trois formes isomères de l'acide aminobenzoïque faisant partie de l'antigène en cause.

Réaction d'Uhlenhuth. — Nous avons eu recours à cette méthode très sensible pour chercher à déceler, si possible, l'espèce des protéides copulées aux « diazo ». En utilisant l'antigène dilué à 1/20.000, nous avons observé la formation d'un anneau blanc quelle que soit l'origine des protéides. Pour constater une réaction spécifique de l'espèce de l'azoprotéide immunisant (cheval) nous avons dû opérer en présence d'antigène test dilué à 1/40.000.

Par contre, la différenciation chimique est très nette même aux dilutions assez faibles (1/5.000).

Réaction de fixation du complément. — Cette méthode ne nous a pas permis de noter une spécificité chimique aussi stricte que les précédentes réactions. Dans quelques cas, nous avons obtenu la fixation du complément en présence du seul antigène identique, mais les résultats sont beaucoup moins constants que lorsque nous employons les autres méthodes biochimiques. Cette observation nous permet d'envisager la présence dans l'immunsérum de diverses formes d'anticorps de comportement différent (sensibilisatrice et précipitine).

Dans une autre série d'expériences, nous avons comparé le pouvoir allergique de ces azoprotéides. C'est ainsi que nous avons pu confirmer le fait démontré récemment par LANDSTEINER à savoir que : il est possible de déclencher le choc anaphylactique chez les cobayes sensibilisés aux azoprotéides, par une simple injection intra-veineuse d'azocomposé correspondant.

Réaction de Schultz-Dale. — Cette méthode nous a donné de très bons résultats. Opérant sur des fragments d'intestin de cobayes sensibilisés à l'azoprotéide de cheval (sulfanilique), nous avons enregistré les contractions normales et les perturbations provoquées par l'addition, dans le bain, de divers antigènes.

Dans une première série d'expériences, nous avons cherché à différencier l'espèce des azoprotéides. Dans ce but, nous avons ajouté dans le bain soit :

a) 2 cm³ de la solution à 1 % d'azoprotéide sulfanilique de cheval.

b) 2 cm³ d'une solution à 1 % d'azoprotéide sulfanilique de lapin.

c) 2 cm³ d'une solution à 1 % d'azoprotéide sulfanilique de poulet.

Dans ces 3 cas, nous avons noté une ascension analogue de la courbe. L'espèce n'a donc plus ici aucune influence.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons com-

paré l'action *in vitro* sur le muscle des azoprotéides dérivés d'acides arylaminés différents. L'addition de 2 cm³ d'une solution à 1 % d'azoprotéide arsanilique ou p-aminobenzoïque, ne provoque qu'un léger sursaut de la courbe (fig. 7).

Dans une troisième série d'expériences, nous avons rem-

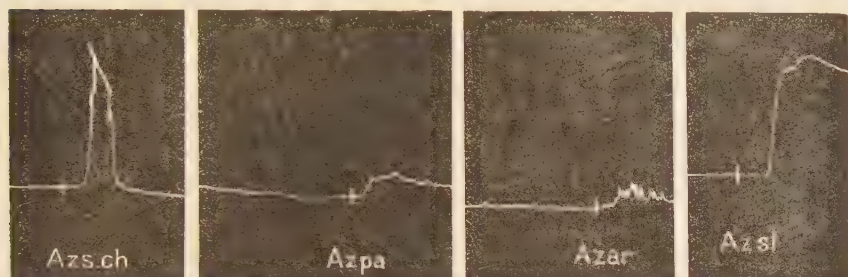


FIG. 7. — Courbe des contractions d'intestin isolé.
Cobaye n° 97 sensibilisé à l'azoprotéide sulfanilique de cheval.

Azs.ch : azoprotéide sulfanilique de cheval.

Azpa : azoprotéide p aminobenzoïque.

Azar : azoprotéide arsanilique.

Azsl : azoprotéide sulfanilique de lapin.

placé la solution d'antigène ajoutée *in vitro*, par une addition d'haptène correspondant. Le graphique suivant (fig. 8) a été obtenu avec les fragments d'un intestin de cobaye sensibilisé à l'azoprotéide de l'acide o-aminobenzoïque. En ajoutant, dans le bain physiologique, 2 cm³ d'une solution du produit obtenu en copulant l'acide diazo o-aminobenzoïque avec la

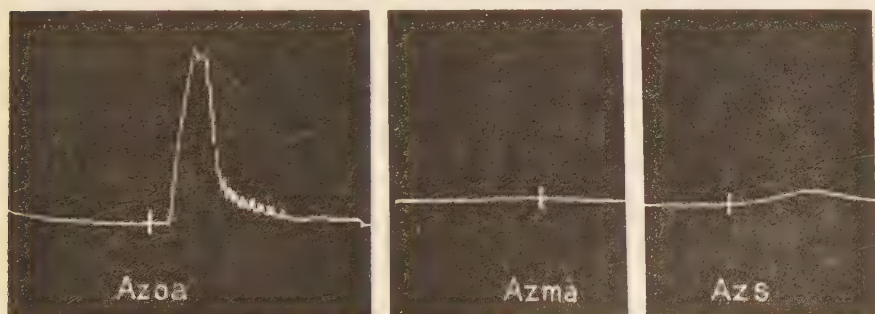


FIG. 8. — Courbe des contractions d'intestin isolé.
Cobaye n° 42 sensibilisé à l'azoprotéide o-aminobenzoïque de cheval.

Azoa : azotyrosine o-aminobenzoïque (poulet).

Azma : azotyrosine m-aminobenzoïque (poulet).

Azs : azotyrosine sulfanilique (poulet).

Chaque addition correspond toujours à 2 cc. d'une solution d'antigène à 1 %.

tyrosine pure, nous avons provoqué une forte ascension de la courbe. Par contre, l'addition du même volume de l'haptène obtenu en partant de l'acide p ou m-amino-benzoïque, n'a apporté aucune modification de l'amplitude des contractions normales.

Nous avons fait des expériences témoins sur des muscles de cobayes normaux, pour nous assurer qu'aucun de nos antigènes ou de nos haptènes à la dilution mentionnée ci-dessus, ne modifiait la courbe des contractions.

Réaction de Prausnitz-Kustner. — Nous avons obtenu une réaction locale très caractéristique par injection d'azoprotéide arsanilique de cheval (0 cm³ 3 d'une solution à 0,5 %) succédant à une première injection intra-dermique d'immunsérum correspondant (0 cm³ 5) (fig. 9, pl. II).

Sur un lot de cobayes ayant reçu une première injection intra-dermique d'immunsérum, comme précédemment, nous avons fait varier la constitution de l'antigène dans la deuxième inoculation. Nous avons noté des réactions croisées très nettes entre les azoprotéides d'espèces différentes, mais jamais entre les antigènes tests de groupe chimique dissemblable.

Toutes ces réactions immunologiques nous ont permis de démontrer que les fonctions acides modifient totalement la spécificité de l'antigène de base. Les propriétés (sérologiques et allergiques) du nouvel antigène sont en rapport non seulement avec la nature du groupe acide, mais avec sa constitution stéréoisomérique. L'influence de l'espèce des protéides initiaux est infiniment réduite. D'autre part, nos résultats ne nous permettent pas de rapprocher sérologiquement les azoprotéides des aminoprotéides.

III

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES AMINOPROTÉIDES

Nous avons indiqué au chapitre premier que nous obtenons les aminoprotéides par réduction :

- a) des xanthoprotéides ;
- b) des azoprotéides.

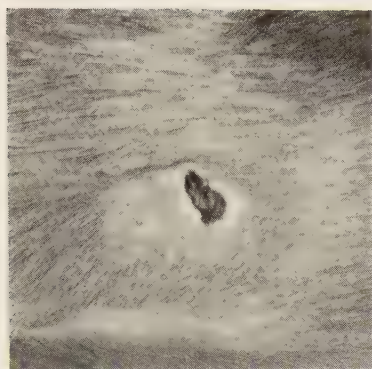


FIG. — 3. — Intra-dermo-réaction. Cobaye n° 95 sensibilisé au xanthoprotéide de cheval, a reçu une injection déchaînante de xanthoprotéide de lapin.

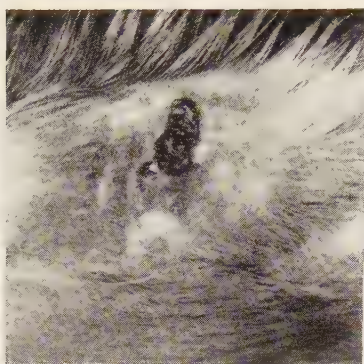


FIG. 9. — Réaction de Prausnitz-Küstner. Cobaye n° 62 a reçu une injection préparante de sérum anti-azoprotéide de cheval et une injection déchaînante d'antigène azoprotéide de mouton.

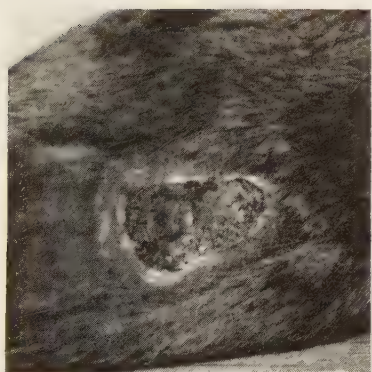


FIG. 10. — Phénomène d'Arthus. Cobaye n° 19. Escarre apparue au bout de la 4^e injection d'aminoprotéide de lapin.



FIG. 11. — Intra-dermo-réaction. Cobaye n° 20 sensibilisé à l'aminoprotéide de mouton, a reçu une injection déchaînante d'aminoprotéide de cheval.

Nous avons utilisé les deux produits de réduction obtenus, pour provoquer, chez les animaux, l'immunisation ou l'état allergique, mais nous n'avons noté aucune différence entre les résultats. Nous avons observé au contraire, entre ces deux antigènes, des réactions croisées mettant en évidence leur identité sérologique. On a donc affaire vraisemblablement, dans les deux cas, à un produit de même composition chimique : les groupements NH^2 se trouvant fixés dans la même position sur les noyaux aromatiques des protéides.

Nous ne différencierons donc pas ici ces aminoprotéides. Ce sont d'excellents antigènes, comme nous l'avons établi par les réactions suivantes :

Réaction de précipitation. — Par inoculations répétées d'une solution d'aminoprotéide à 2 %, nous avons constaté, *in vitro*, une précipitation en présence de l'antigène test jusqu'à la dilution 1/200.000.

Nous avons envisagé que le caractère zoologique à peine sensible dans les azoprotéides, put n'être que masqué par le groupe diazo dominant. Il aurait été alors susceptible de réapparaître après réduction. Il n'en est rien ; la spécificité ne dépend plus de l'espèce du sérum, mais seulement des groupes aminés fixés sur les noyaux aromatiques des protéides.

Nous avons réussi facilement à immuniser des lapins en utilisant un aminoprotéide homologue. Après 6 injections intra-veineuses de 2 cm³ chacune, d'une solution d'antigène à 2 %, nous obtenions un sérum précipitant de titre élevé, comme le montre le tableau suivant :

TABEAU 5

Antigènes	Immunsérum d'Aminoprotéide de lapin						
AmP Lapin.....	++	++±	+++	+++	++	+	±
AmP Chien	++	++	+++	++	++	++	+
AmP Mouton.....	+	+	++±	+	++	++	+
AmP Porc	±	+	±±	+	+	±	+
AmP Bœuf	tr	±	+	+	+	+	±
AmP Cheval.....	++	++±	+++	+++	+++	++	+
	1	1	1	1	1	1	1
Dilut. d'antigène...	50	100	500	1.000	5.000	10.000	100.000

Lecture après une nuit à la glacière
(antigène : 0 cc 2. — I-S : II gouttes)

Le précipité observé ici est beaucoup plus fin que dans le cas des xanthoprotéides ou des azoprotéides. Il se dépose sous forme d'une fine pellicule dans le fond des tubes. Toutefois, si on augmente progressivement les dilutions de l'antigène, on voit le flocculat se présenter d'abord sous la forme de gros grains qui diminuent ensuite. On constate ainsi une zone de floculation optima (tableau 5) qui ne correspond pas toujours à la plus forte concentration d'antigène, mais qui est probablement en rapport avec les proportions les plus favorables du mélange antigène-anticorps. La situation de cette zone varie évidemment avec le titre du sérum.

Nous n'avons observé ni précipitation notable en utilisant le sérum normal pur comme antigène test, ni réactions croisées entre aminoprotéides et xantho ou azoprotéides.

Réaction d'Uhlenhuth. — Cette réaction est venue confirmer les résultats précédents. Le caractère d'espèce n'a aucune influence sur la formation de l'anneau blanc caractéristique au contact des deux solutions d'antigène et d'immunsérum.

Par contre, le caractère chimique de notre antigène a une valeur spécifique incontestable : les protéides nitrés ou les azoprotéides sont incapables de réagir en présence du sérum anti-aminoprotéide.

Au cours de nos travaux sur les aminoprotéides, il nous a paru intéressant de chercher à saturer, *in vivo*, les anticorps contenus dans l'immunsérum, par une simple injection massive de l'antigène correspondant. Pour effectuer ce travail, nous avons suivi la technique de NIZEGORODZEFF. Cet auteur neutralisait ainsi les hétéro-précipitines contenues dans un immunsérum obtenu à partir de protéides d'une espèce déterminée. (Dans la préparation d'un sérum anti-protéides de cheval, il éliminait les précipitines anti-protéides de porc ou anti-protéides de bœuf par injections à l'animal d'expérience de sérum de porc ou de bœuf. Il titrait le pouvoir précipitant de l'immunsérum après chaque nouvelle inoculation).

Après avoir mesuré le pouvoir précipitant de notre sérum anti-aminoprotéide par la méthode d'UHLENHUTH, nous avons injecté au lapin immunisé, une dose de 12 cm³ d'une solution à 2 % d'aminoprotéide par voie intra-veineuse. Au bout d'une

semaine, nous avons saigné le lapin et nous avons comparé son sérum avec celui qui avait été prélevé avant l'injection de 12 cm³. La neutralisation des précipitines était réelle puisque la réaction d'UHLENHUTH, positive dans le premier cas en présence d'une dilution d'antigène de 1/50.000, ne donnait plus dans le second cas l'anneau caractéristique, au delà de 1/1.000.

Réaction de fixation du complément. — En utilisant des solutions d'aminoprotéides de cheval, de lapin, de mouton ou de porc, nous avons observé la fixation du complément sans distinction de l'espèce en jeu. Dans cette réaction nous avons suivi la technique habituelle, mais nous avons employé un plus grand volume de sérum chauffé (0 cm³ 5) pour la même proportion d'antigène à 1 % (0 cm³ 2).

En opérant avec le sérum dont nous avons tenté de saturer les anticorps, nous n'avons jamais obtenu la fixation du complément.

L'adjonction des radicaux NH^2 sur le sérum, n'a pas modifié le pouvoir sensibilisant et nous avons noté des réactions cutanées allergiques très caractéristiques.

Phénomène d'Arthus. — Sur 12 cobayes recevant chaque jour, une injection intra-dermique d'aminoprotéide de cheval (0 cm³ 1 d'une solution à 0,5 %), 9 ont réagi par formation d'une escarre au bout de la 4^e ou 5^e inoculation (fig. 10, pl. II). D'autres cobayes sensibilisés par une injection d'aminoprotéide de mouton, ont donné des phénomènes nécrotiques après l'injection déchainante d'aminoprotéide de cheval ou de lapin pratiquée au bout d'un mois (fig. 11, pl. II).

Phénomène de réactivité locale cutanée. — Des lapins, ayant reçu dans l'épaisseur du derme, sur le flanc, une injection d'aminoprotéide (0 cm³ 5 d'une solution à 1 %), puis quarante-huit heures après, une autre injection de 3 cm³ du même antigène par voie intra-veineuse, ont réagi fortement par la formation d'une large escarre avec zone hémorragique, qui a atteint son maximum d'intensité au bout de trois jours environ.

La réaction croisée entre aminoprotéide de mouton, de cheval ou de porc a donné les mêmes résultats sans distinction d'espèce. Mais nous n'avons observé aucune réaction cutanée croisée entre le sérum pur et un aminoprotéide quelconque.

Dans ces cas d'inflammation provoquée, l'escarre n'apparaît pas toujours au point même de la première inoculation. Nous avons constaté parfois, l'apparition de la plaque nécrotique de l'autre côté du flanc. Ce fait peut s'expliquer par l'existence d'une zone, de moindre résistance.

Réaction de Schultz-Dale. — Opérant sur l'intestin isolé de cobayes sensibilisés à l'aminoprotéide de cheval, nous avons

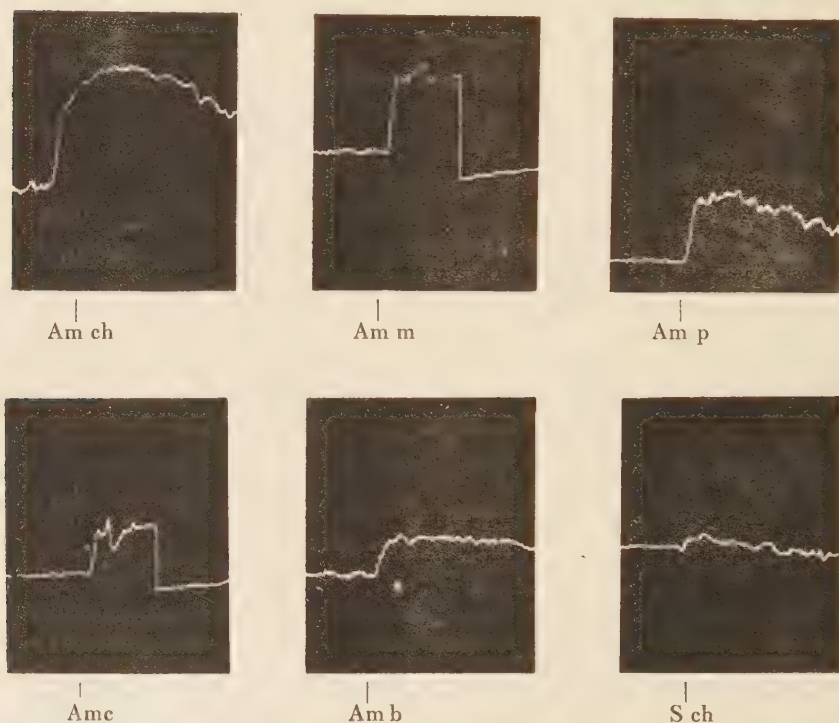


FIG. 12. — Courbe des contractions d'intestin isolé.
Cobaye n° 1 sensibilisé à l'aminoprotéide de cheval. Chaque addition correspond à 1 cc. d'antigène (dilution 1 %).

Amch : aminoprotéide de cheval,
Amm : aminoprotéide de mouton,
Amp : aminoprotéide de poulet,
Amc : aminoprotéide de chien,
Amb : aminoprotéide de bœuf,
Sch : sérum cheval pur.

constaté que l'addition, dans le bain, d'un même antigène (1 cm³ à la même dilution), provoque une forte élévation de la courbe. L'aminoprotéide de cheval, de mouton et de poulet nous ont donné les mêmes réponses. L'addition dans le bain physiologique, de sérum pur de cheval n'a amené aucune perturbation dans la courbe des contractions normales (fig. 12).

En résumé, nos travaux sur les aminoprotéides, nous ont permis de constater que le pouvoir antigénique du sérum, n'est pas altéré par le double traitement chimique que nous lui faisons subir (nitration ou copulation, puis réduction), mais par contre la spécificité de provenance est totalement détruite. Ces résultats concordent avec ceux d'HOPKINS et WORMALL (1934). Ces auteurs n'utilisaient pas notre technique puisqu'ils bloquaient les fonctions aminées des protéides au lieu d'apporter de nouveaux radicaux NH^2 sur la molécule du sérum. Mais ils concluaient, comme nous, à la disparition totale de tout caractère d'espèce. Les fonctions aminées ont donc une réelle influence immunologique. Nous l'avons mise en évidence par les réactions sérologiques et les réactions allergiques.

IV

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA DINITRO-3,5-TYROSINE

Nous avons vu que ce composé nitré, dérivé de la tyrosine, s'apparente de près aux xanthoprotéides puisqu'il est capable de provoquer l'inhibition de la précipitation antigène-anticorps, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre. Nous avons recherché si cette dinitrotyrosine ne possède pas un pouvoir antigénique. Utilisant une solution à 0 gr. 6 % de ce composé sous forme de sel de sodium, nous avons pratiqué une dizaine d'inoculations intra-veineuses de 3 cm³ chacune à raison de deux par semaine. Nous avons recueilli l'immunsérum et nous avons étudié *in vitro* ses propriétés, à l'aide des réactions biochimiques habituelles.

Réaction de précipitation. — Un premier immunsérum contenait suffisamment de précipitines pour donner une réaction positive en présence de dinitrotyrosine jusqu'à la dilution

1/10.000. Le tableau 6 montre l'intensité de la précipitation. Nous avons utilisé 0 cm³ 2 de notre antigène pour III gouttes d'immunsérum. Nous avons fait de nombreuses expériences témoins en remplaçant notre antisérum par divers autres sérums normaux, nous n'avons jamais constaté cette précipitation.

TABLEAU 6.

Dilutions d'antigène	Antigène (dinitrotyrosine)						T
	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	$\frac{1}{5.000}$	$\frac{1}{10.000}$	$\frac{1}{20.000}$	
Immunserum anti-dinitro-3-5-tyrosine.	++±	++	+±	+	±	tr	0

Lecture après 48 heures à la glacière.

Sur un autre lapin, qui avait supporté six inoculations de la même solution neutre de dinitrotyrosinate de sodium, le pouvoir précipitant de l'immunsérum, bien que plus faible était encore manifeste jusqu'à la dilution de 1/4.000. Toutefois, le précipité est plus long à se former que dans le cas des vrais antigènes protéidiques. C'est seulement après un séjour de vingt-quatre heures à la glacière, qu'apparaît un flocculat très fin facilement visible à l'agglutinoscope ; au bout de quarante-huit heures, le précipité est devenu très apparent : les micelles étant arrivées à un stade de complète maturité. Les tubes témoins, contenant 0 cm³ 2 d'eau physiologique en présence de l'immunsérum, ne présentent aucun trouble.

Nous avons ensuite recherché si cet antigène était capable de créer l'état allergique chez les animaux, mais nous n'avons étudié que quelques réactions dermiques.

Réaction de Prausnitz-Kustner. — Nous avons divisé un lot de cobayes en trois séries. La première série recevait une injection intra-dermique de 0 cm³ 5 d'immunsérum de lapin (ayant subi 8 inoculations de dinitro-3,5-tyrosine), puis au bout de vingt-quatre heures, une inoculation de 0 cm³ 3 de dinitrotyrosine en solution à 0,5 %. Deux jours après la der-

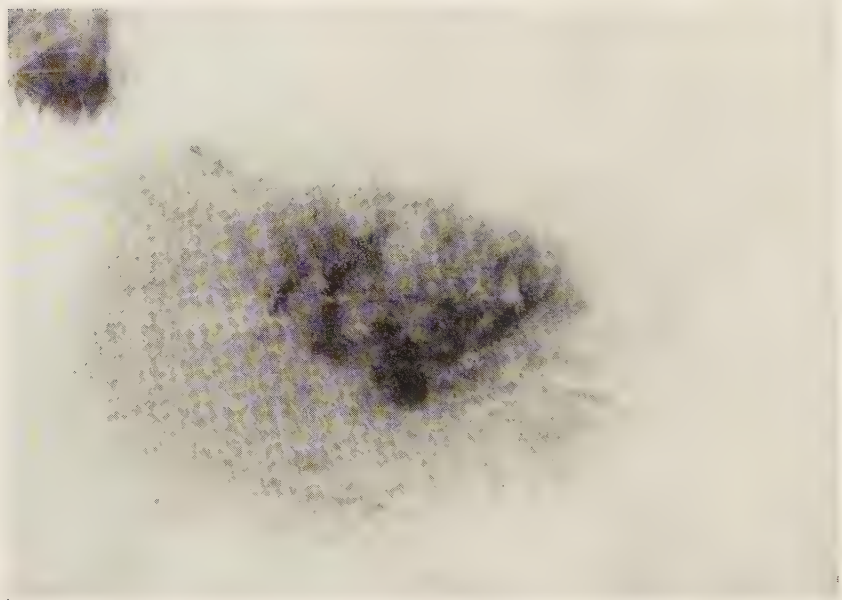


FIG. 13. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Nécrose observée sur le flanc du lapin n° 55, ayant reçu une injection intra-dermique de dinitro-3-5-tyrosine et une injection intra-veineuse déchaînante du même composé.

(I. P. Serv. Phot.).

nière injection, nous avons noté l'apparition d'une petite escarre très localisée sans œdème.

La deuxième série recevait un seule injection intra dermique d'immunsérum ($0\text{ cm}^3\ 5$) et la troisième série, une injection de dinitrotyrosine ($0\text{ cm}^3\ 3$). Dans ces deux derniers cas, nous n'avons relevé aucune lésion cutanée locale.

Phénomène de réactivité locale cutanée. — Nous avons, comme précédemment, eu recours à la technique de SHWARTZMAN. Notre solution d'antigène était diluée à 2 %. La première injection intra-dermique était de $0\text{ cm}^3\ 5$ et la deuxième intra-veineuse, de 2 cm^3 . Au bout de trois jours une importante escarre s'était développée (fig. 13, pl. III). Nous avons opéré sur un lot de lapins pour suivre l'évolution de l'inflammation locale, en fonction du temps. Ce travail histologique fait l'objet du chapitre cinquième.

V

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES AZOTYROSINES

Dans les expériences de LANDSTEINER et VAN DER SCHEER, les azocomposés, où le sérum était remplacé par le résorcinol, se comportaient, *in vitro*, comme des « haptènes précipitants », et étaient capables d'autre part de déclencher le choc anaphylactique chez les cobayes sensibilisés aux azoprotéides correspondants. Nous avons essayé d'immuniser les animaux avec une autre série d'azocomposés chimiquement définis, se rapprochant beaucoup de nos précédents antigènes, puisque le sérum y était remplacé par la l-tyrosine pure (qui est supposée intervenir dans la composition des azoprotéides).

Par injections intra-veineuses répétées d'une solution d'acide sulfanilique-diazo-tyrosine, à 1,5 %, nous avons constaté, chez le lapin, la formation d'anticorps décelés par les réactions suivantes :

Réaction de précipitation. — Le titre de l'immunsérum de nos « azotyrosines », a toujours été moins élevé que lorsque nous utilisions un antigène à base de sérum. D'autre part,

les réactions croisées entre azotyrosine et azoprotéide, n'ont pas été aussi nettes que nous le présumions. Ce résultat serait en faveur de l'intervention d'amino-acides autres que la tyrosine, dans la copulation du sérum avec les sels de diazo. La spécificité sérologique s'est montrée ici encore en relation étroite avec la composition chimique de l'acide arylaminé du diazo (tableau 7).

TABLEAU 7

Antigènes	I-S de l'azotyrosine sulfanilique							
Azotyr. sulfanil..	+++	++	+±	+	+	±	tr.	f. tr.
AzP sulfanil....	+	±	±	±	tr.	f. tr.	0	0
Azotyr. arsanil..	tr	f. tr.	f. tr.	0	0	0	0	0
Azotyr. { ortho..	tr	tr.	tr.	f. tr.	0	0	0	0
amino- { méta..	f. tr	0	0	0	0	0	0	0
benzoïq. { para..	±	tr.	f. tr.	f. tr.	f. tr.	0	0	0
Dilut. d'antigène.	2	1	1	1	1	1	1	1
	100	100	500	1.000	2.000	5.000	10.000	20.000

Lecture après 24 heures à la glacière.

Réaction d'inhibition. — En utilisant la méthode décrite par ERLÉNMEYER et BERGER, nous avons constaté l'inhibition complète de la réaction précédente.

Ainsi en ajoutant 0 cm³ 6 de sulfanilate de sodium en solution à 2% au mélange azotyrosine sulfanilique et immunsérum correspondant, les précipitines ont été neutralisées totalement. Dans les mêmes conditions l'addition d'atoxyl ou d'aminobenzoate, n'a provoqué aucune inhibition de la précipitation.

La réaction d'UHLÉNTHUTH, qui nécessite vraisemblablement le contact de deux substances albuminoïques n'a pu être obtenue dans ce cas.

Parmi les réactions allergiques, déclenchées par de simples azocomposés, divers auteurs ont étudié la formation du choc anaphylactique et le phénomène de SCHULTZ-DALE. Nous nous sommes adressée à deux autres manifestations de l'hyperergie.

Réaction de Prausnitz-Kustner. — Bien que l'immunsérum précédent ne soit pas très riche en précipitines, une injection intra-dermique de 0 cm³ 5 faite au cobaye, détermine, si elle

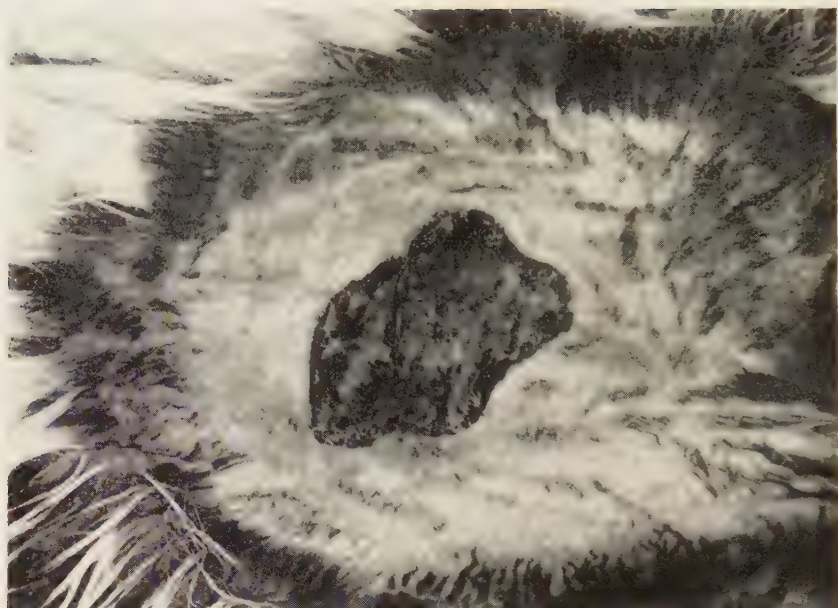


Fig. 14. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Lapin n° 64. Escarre de 2 jours. Injections préparante et déchainante d'azotyrosine sulfanilique.

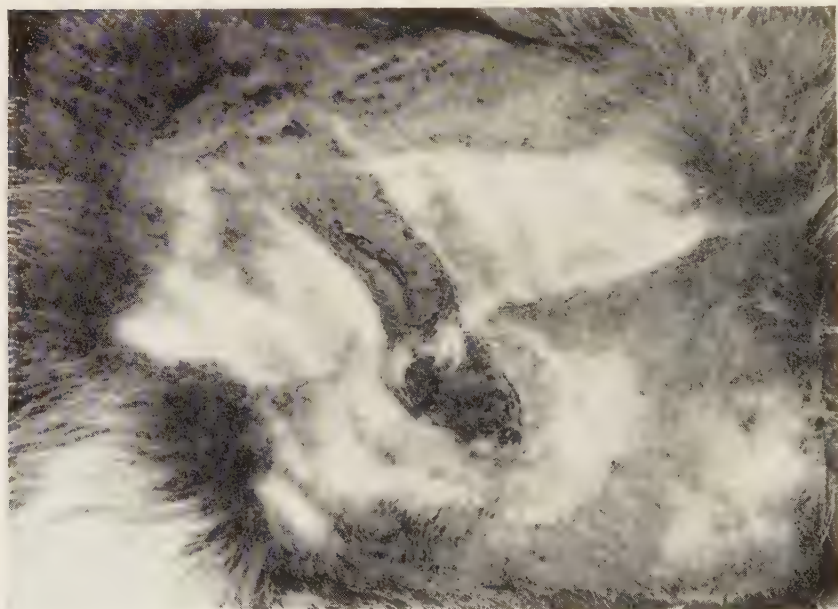


Fig. 15. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Lapin n° 63. Escarre de 3 jours. Injections préparante et déchainante d'azotyrosine m-amino-benzoïque.

est suivie au bout de vingt-quatre heures d'une injection au même point de 0 cm³ 2 d'azotyrosine sulfanilique à 1 %, la formation d'une nécrose cutanée très apparente au bout de quarante-huit heures environ.

A cette même dilution, l'antigène inoculé à des cobayes témoins, ne donnait lieu à aucune inflammation.

Phénomène de réactivité locale cutanée. — Nous avons constaté que cette réaction est positive avec notre azocomposé, mais pas chez tous les animaux d'expérience. (SHWARTZMAN avait noté dans ses expériences 70 % environ de cas positifs pour un même produit.) Nous avons [noté que tous les animaux qui présentaient localement une rougeur en auréole quelques heures après la première injection intra-dermique, réagissaient à la deuxième injection intra-veineuse, par la formation d'une importante escarre.

En utilisant 0 gr. 05 d'azotyrosine sulfanilique, pour chaque inoculation pratiquée en suivant la technique habituelle, nous avons observé l'apparition d'une escarre ronde de 2 cm³ de diamètre, sans œdème périphérique (fig 14, pl. IV).

Sur d'autres lapins, nous avons essayé l'azotyrosine de l'acide m-aminobenzoïque dans les mêmes proportions : nous avons encore obtenu une inflammation locale entourée d'un léger œdème. Au bout de deux jours, l'escarre devient noirâtre et sèche (fig. 15, pl. IV).

Avec le composé diazo de l'acide o-aminobenzoïque, l'apparition de la nécrose semble retardée. Elle n'est manifeste que trois jours après l'injection déchainante intra-veineuse et elle a toujours été beaucoup moins importante.

Avec l'azotyrosine arsanilique, l'escarre est très étendue et apparaît après vingt-quatre heures.

Le fait d'avoir obtenu cette réaction allergique à l'aide de substances de composition chimique définie, nous a paru suffisamment intéressant pour mériter une étude histologique du phénomène. Nous exposerons au chapitre suivant quelques observations s'y rattachant.

On savait déjà qu'il est possible de déclencher certaines réactions anaphylactiques, en utilisant les azocomposés de constitution déterminée. Nos résultats prouvent, que l'inject-

tion d'antigènes dépourvus de protéides est parfois capable de susciter *in vivo* la formation d'anticorps spécifiques. Ainsi, dans certains composés, la tyrosine pure peut tenir le rôle de substance activante. Cependant son pouvoir antigénique est plus faible que celui des protéides du sérum. En partant de ces dérivés de la tyrosine, nous avons obtenu également des réactions allergiques cutanées très spécifiques.

CHAPITRE CINQUIÈME

Observations histologiques sur le phénomène de réactivité locale ⁽¹⁾

En suivant la technique décrite par SHWARTZMAN, nous avons obtenu, au cours de nos travaux, des réactions cutanées très caractéristiques, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent. Il nous a paru intéressant de procéder à l'examen histologique de ce phénomène.

Nous voulons seulement esquisser l'étude des lésions cutanées, sans approfondir encore la question, en raison du nombre insuffisant de pièces prélevées aux stades de début du processus réactionnel.

Pour procéder à l'examen histologique, nous avons soumis les animaux à une coloration préalable des tissus.

Coloration vitale des animaux. — Pour réaliser une bonne coloration vitale, nous avons injecté aux lapins en expérience du bleu de trypan en solution à 1 % dans l'eau physiologique à la dose totale de 10 cm³ par kilo d'animal ; cette dose a été injectée en trois fois à trois jours d'intervalle ; du dixième au quatorzième jour après la première inoculation, l'animal est parfaitement bleui. C'est à cette date qu'il faut prélever les pièces si on veut observer la meilleure coloration des tissus.

Afin d'éviter les phénomènes de diffusion du colorant, on

1. Pour effectuer cet examen, nous avons suivi les directives de M. le Pr. PEYRON et nous avons travaillé en collaboration avec M. le Dr POUMEAU-DELILLE. Nous les prions de trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

a intérêt à injecter le bleu à distance de la région à examiner ; lorsqu'on veut prélever la peau du flanc, il suffit ainsi d'injecter la solution colorante dans le muscle de la cuisse. L'inoculation intra-musculaire nous a donné d'excellents résultats et l'emploi de la voie veineuse nous a paru inutile.

Fixation des pièces. — Après un certain nombre de recherches, la fixation la meilleure a été réalisée avec le liquide de Suza. (Composition : NaCl : 0,5, $\text{CCl}^3\text{CO}^2\text{H}$: 2 gr., $\text{CH}^3\text{CO}^2\text{H}$: 2 cm^3 , HgCl^2 : 4 gr. 5, HCHO : 20 cm^3 , eau distillée à 100 cm^3).

Immédiatement après leur prélèvement, les diverses pièces à examiner sont fixées durant vingt-quatre heures dans une quantité assez abondante de liquide de Suza ; puis, après les passages dans les alcools et le toluène, ces pièces sont incluses à la paraffine. Les coupes de 6 à 7 μ sont ensuite colorées au carmalum. Cette seule coloration de contraste permet d'étudier facilement la coloration vitale qui est parfaitement fixée.

Etude du phénomène de réactivité locale. — Les lésions cutanées réalisées par l'inoculation de nos antigènes en suivant la technique de SHWARTZMAN, ont été prélevées à des âges différents, depuis quelques heures jusqu'à plusieurs jours après leur production. Nous avons étudié spécialement les réactions cutanées provoquées par nos antigènes chimiquement définis : la dinitro-3,5-tyrosine et les azotyrosines.

1^o *Dans les vingt-quatre premières heures* (1), on observe sur les coupes de peau qui sont le siège du phénomène, une réaction inflammatoire intense. Celle-ci apparaît très précocement ; elle est très nette au bout de deux heures trente et se traduit par une dilatation vasculaire marquée avec afflux puis diapédèse leucocytaire, et œdème associé. L'œdème distend l'épiderme jusqu'au muscle peaucier ; la diapédèse leucocytaire est constituée en majeure partie de polynucléaires avec de rares monocytes. On peut encore observer des lésions

1. Après l'injection intra-veineuse déchaînante.

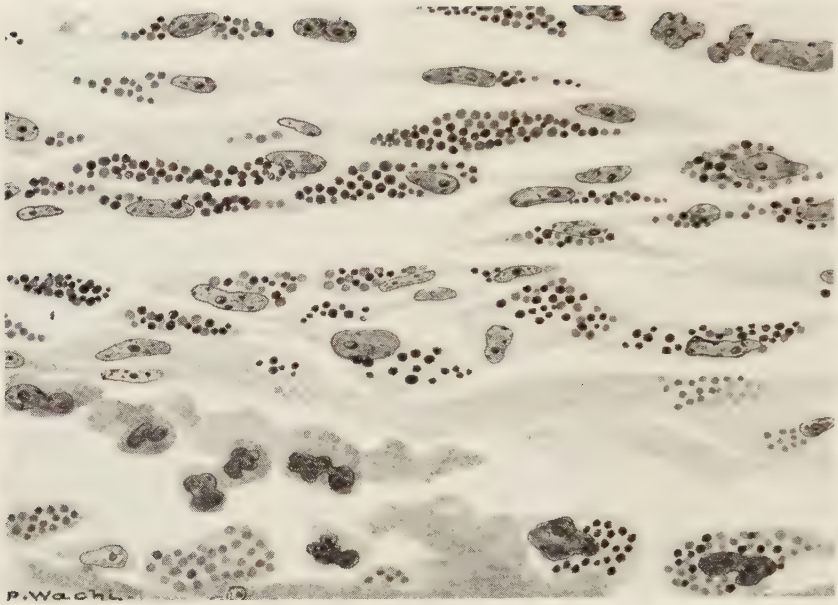


FIG. 16. — Lésion de 3 jours.

En bas : la périphérie de l'abcès au niveau de laquelle on retrouve, irrégulièrement mélangés, des polynucléaires et des histiocytes (ces derniers seuls imprégnés par le bleu trypan, la coloration vitale).

Au-dessus : paroi fibroblastique dans laquelle les polynucléaires sont moins nombreux. Les histiocytes ont une forme allongée ou irrégulière ; ils ne proviennent pas de la diapédèse des monocytes du sang, mais ils sont issus exclusivement des fibroblastes. Ce fait distingue le phénomène de réactivité locale cutanée, des réactions d'immunité générale.

vasculaires précoces avec thrombose capillaire et hémorragies.

A ce stade, la réaction des histiocytes locaux est minime ou nulle ; de rares fibroblastes apparaissent chargés de bleu trypan.

2° *A partir de la vingt-quatrième heure*, on assiste à la constitution d'un abcès aseptique : au centre de la zone œdémateuse, infiltrée de polynucléaires entre l'épiderme et le muscle, apparaît une zone pyoïde encore mal limitée et entourée d'une autre zone contenant surtout des polynucléaires, quelques monocytes, quelques fibroblastes chargés de bleu dont le nombre va augmenter peu à peu jusqu'au troisième jour.

3° *Au troisième jour*, s'est constitué un abcès aseptique avec une zone pyoïde centrale plus ou moins étendue mais bien limitée, en plein derme. La diapédèse des polynucléaires qui l'entoure diminue, alors que se constitue une importante barrière fibroblastique qui va limiter l'abcès. Cette barrière est formée avant tout de fibroblastes et d'histiocytes locaux résultant de leur transformation, ainsi qu'en témoigne leur coloration vitale par le bleu trypan.

A noter cependant la présence, à distance de l'abcès, de quelques nodules de monocytes périvasculaires (fig. 16, pl. IV).

4° *A partir du troisième jour*, la réaction fibroblastique limitant l'abcès, se complète pour aboutir à la résorption de la zone pyoïde comme dans un abcès aseptique banal.

En résumé : le phénomène de réactivité locale provoque très rapidement (dès la deuxième heure) un œdème et une infiltration polynucléaire importante avec des lésions vasculaires associées (thrombose, hémorragies). La réaction des histiocytes du plan local (fibroblastes, péricytes) minime ou nulle au premier stade, s'accroît ultérieurement.

De nouvelles recherches sont indispensables pour élucider la signification de la diapédèse de monocytes sanguins que l'on observe assez localisée et inconstante ; mais cette diapédèse est beaucoup moins importante que celle observée dans les réactions d'immunité.

CHAPITRE SIXIÈME

I

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE CERTAINS ANTIGÈNES DANS L'ORGANISME

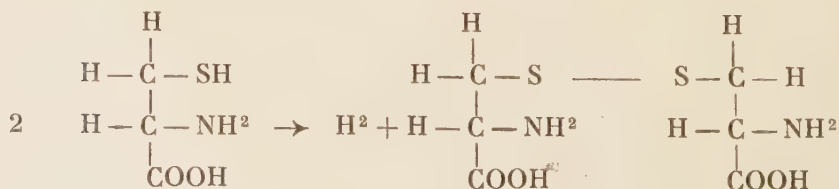
Pour déterminer si les azocomposés qui nous ont servi d'antigènes, se coupent dans l'organisme, nous avons eu recours à deux méthodes empruntées aux travaux de M. et Mme J. TRÉFOUEL, NITTI et BOVET, sur le comportement *in vivo*, de certains colorants thérapeutiques.

La première méthode se borne à suivre *in vitro*, la vitesse de réduction des composés azoïques, soit en les mettant en présence de cystéine (réducteur simple de l'organisme), soit en les laissant simplement en contact avec de l'hydrogène naissant, en utilisant le platine comme catalyseur (électrode rotative à hydrogène de LECOMTE DU NOÛY).

La deuxième méthode consiste à rechercher dans l'urine, les produits éliminés par les animaux ayant reçu, par une voie quelconque, des colorants azoïques. Si ces composés se sont normalement coupés dans l'organisme, l'urine contiendra des substances arylaminées, susceptibles d'être diazotées et copulées en redonnant un colorant.

A. — RÉDUCTION *in vitro*.

1^o Technique de réduction par la cystéine. — Pour une molécule d'azocomposé, nous avons employé 4 molécules 1/2 de cystéine (chlorhydrate).



Après avoir opéré les dilutions nécessaires, nous avons mis en présence 1 cm³ de chacune des deux solutions, dans une ampoule scellée, pour éviter toute perte d'hydrogène dans l'atmosphère. Pour accélérer la réduction, nous avons placé les ampoules au bain-marie bouillant. Nous avons alors noté le temps nécessaire pour obtenir la décoloration complète de la substance azoïque. Le pH joue ici un grand rôle. En milieu acide, la réduction est beaucoup plus rapide ; malheureusement nos antigènes ne sont solubles qu'en milieu légèrement alcalin. Il a donc été nécessaire de neutraliser la solution de chlorhydrate de cystéine.

Pour opérer dans des conditions précises, il faut évidemment connaître le poids moléculaire de la substance que l'on désire réduire par la cystéine. C'est la raison pour laquelle nous sommes partie des azotyrosines de constitution chimique définie et certainement très voisine de celle des azoprotéides.

En employant une solution d'azotyrosine de l'acide p-aminobenzoïque, au pH 7,3, la réduction a demandé quinze minutes au bain-marie bouillant. Au début de l'expérience la liqueur était brune ; au bout d'un quart d'heure, elle est devenue jaune pâle et cette teinte n'a pas varié pendant la demi-heure qui a suivi. Nous avons eu soin de faire des expériences témoins pour comparer graduellement la coloration.

En partant d'une solution d'azotyrosine de l'acide o-aminobenzoïque, nous n'avons noté une réduction complète (teinte stable) qu'au bout d'une demi-heure. Ici, la solution était à pH 8 ; elle était brun-rouge au début de l'expérience et blond-rosé à la fin.

2° Réduction au moyen de l'électrode à H. — Nous avons utilisé cette méthode pour comparer avec les résultats précédents. Ici encore nous n'avons pas employé les azoprotéides qui risqueraient d'empoisonner l'électrode (dépôt de soufre).

Pour réduire notre solution azoïque, il suffit de la mettre en contact avec l'électrode saturée d'hydrogène et de la laisser en présence jusqu'à décoloration totale.

En opérant avec une solution à 1 % d'azotyrosine de l'acide p-aminobenzoïque (0 cm³ 3 pour 0 cm³ 2 d'hydrogène), la déco-

loration est complète au bout d'une heure et demie environ. Nous avons noté un pH stable de 7,9.

En partant de 0 cm³ 3 d'une solution d'azotyrosine de l'acide o-aminobenzoïque à 2 % et de 0 cm³ 2 d' H , la réduction a demandé trois heures environ. La teinte de la solution a passé du brun-rouge au jaune clair, et n'a plus varié dans les heures suivantes. Le pH , stable à la fin de l'expérience, était 8,13.

Ces quelques résultats prouvent que nos antigènes azoïques sont facilement réductibles, beaucoup plus rapidement que les colorants du type trypan bleu ; ils semblent se rapprocher plutôt des dérivés de la chrysoïdine.

B. — RÉDUCTION *in vivo*.

Nous avons poursuivi cette étude en recherchant dans l'urine des lapins (ayant subi une injection de substance azoïque) la présence de produits diazotables.

Technique : A 1 cm³ d'urine, on ajoute 9 cm³ d'eau distillée, 1 cm³ d'acide trichloracétique et 1 cm³ d'une solution à 0,1 % de nitrite de sodium. On agite pour faciliter la diazotation et on verse, dans cette solution, 5 cm³ de diméthyl-naphtylamine. On observe une coloration rose-violacé caractéristique. On peut comparer la teinte obtenue à une échelle étalon.

Il est indispensable, avant toute expérience, de prélever chez l'animal quelques centicubes d'urine normale pour vérifier qu'elle ne contient aucun produit diazotable comme cela peut se présenter chez le lapin.

1^{er} essai : nous avons injecté au lapin, par voie intra-musculaire, 0 gr. 5 d'azotyrosine de l'acide p-aminobenzoïque. Au bout de deux heures, nous avons prélevé l'urine et nous avons recherché la présence de substances diazotables. La réaction était fortement positive. La coupure de notre azoïque avait mis vraisemblablement en liberté l'acide p-aminobenzoïque et la diamino-3,5-tyrosine, tous deux diazotables.

2^e essai : nous avons injecté au lapin par voie intra-musculaire 0 gr. 7 d'azoprotéide arsanilique de cheval. Nous avons constaté l'élimination de produits diazotables, dans l'urine aussi rapidement que dans le cas des azotyrosines.

Ces résultats prouvent d'une façon certaine que nos antigènes de constitution azoïque, se coupent dans l'organisme pour libérer progressivement des produits aminés. Nous avons calculé la durée d'élimination de produits aminés chez le lapin qui reçoit 0 gr. 5 d'azotyrosine. Nous avons constaté, que durant la première demi-heure qui suit l'injection intramusculaire chez le lapin, il existe dans l'urine de cet animal, une forte teneur en substances diazotables; au bout de vingt-quatre heures la coloration caractéristique des azocomposés est devenue assez faible; après quarante-huit heures, on ne trouve plus que des traces indosables.

II

RECHERCHE DE L'ARSENIC DANS L'IMMUNSÉRUM D'UN LAPIN AYANT SUBI PLUSIEURS INJECTIONS D'ANTIGÈNE ARSENICAL

Pour tenter de mettre en évidence la transformation possible de l'antigène en anticorps correspondant, nous avons recherché l'arsenic dans un immunsérum riche en précipitines anti-azoprotéide de l'acide p-aminophénylarsinique. Nous avons eu recours à la méthode au réactif de BOUGAULT et nous avons utilisé le comparateur à cellules photoélectriques de RHÔNE-POULENC (1).

La première opération consiste à détruire les matières organiques. Nous avons utilisé, à cet effet, le mélange oxydant sulfo-nitro-perchlorique préconisé par KAHANE (SO^4H^2 pur de G. BERTRAND 70 cm³; NO^3H pur 10 cm³; ClO^4H pur 20 cm³), dans la proportion de 25 cm³ de réactif pour 5 cm³ de liquide biologique. La destruction se pratique dans un flacon Kjeldahl muni d'une colonne de Vigreux; la liqueur est maintenue à une douce ébullition jusqu'à décoloration complète. On chasse ensuite les dernières vapeurs nitreuses par une nouvelle ébullition après avoir ajouté quelques centimètres cubes

1. Nous avons suivi la technique décrite par A. SÉVAUX (*Thèse de pharmacie*, 1935. Paris, Jouve, édit.), en y apportant quelques modifications.

d'eau distillée. On refroidit et on complète à 25 cm³ dans une fiole jaugée. Pour le dosage, on prélève 5 cm³ de cette solution et on ajoute 5 cm³ de réactif de BOUGAULT (PO^2Na^3 20 gr.; eau distillée 20 cm³; HCl pur 200 cm³). Ce mélange est porté au bain-marie bouillant pendant une demi-heure.

Pour construire la courbe d'étalonnage, on emploie des solutions titrées d' As^2O^3 dans l'acide chlorhydrique (1 à 10 mgr. par litre d'arsenic). On prépare une série de tubes contenant 5 cm³ de solution titrée et 5 cm³ de réactif de

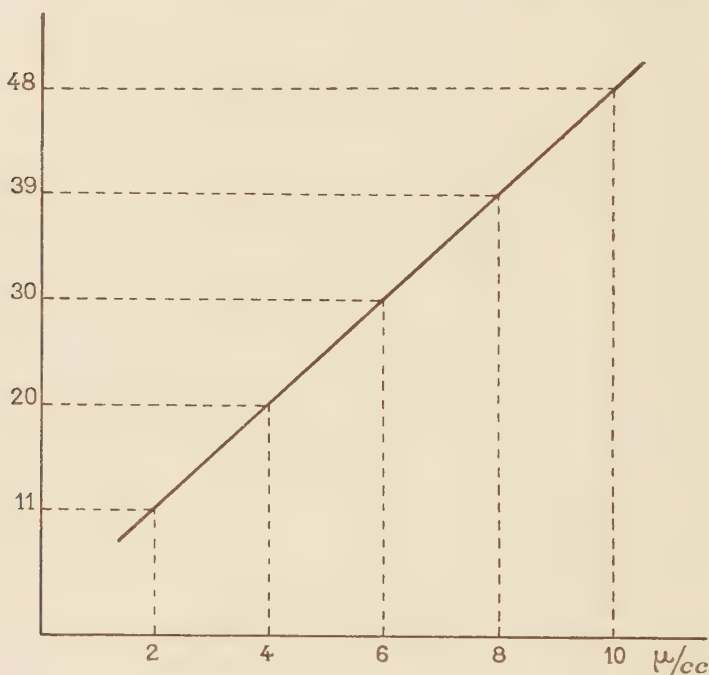


FIG. 17. — Courbe d'étalonnage du comparateur photo-électrique.

BOUGAULT et après chauffage au bain-marie bouillant pendant une demi-heure, on compare les troubles (dus au précipité d'arsenic) au photocolorimètre dont le principe repose sur les différences d'éclairement de deux cellules photoélectriques. Les mesures sont faites en lumière monochromatique bleue traversant 2 solutions dont l'une sert de témoin (eau + réactif de B).

On peut ainsi établir le graphique en portant en ordonnées les divisions du diaphragme et en abscisses la teneur en

arsenic (mgr. par litre). On obtient toujours une droite analogue à celle que nous soumettons ci-dessous, mais plus ou moins déplacée (fig. 17). Il est nécessaire de déterminer chaque fois deux points de la droite. Il suffit à chaque dosage de porter en ordonnées, la division du diaphragme observée avec notre solution et de calculer sur le graphique, l'abscisse correspondante. Cette technique permet d'évaluer (avec des erreurs inférieures à 5 %) des teneurs en As de l'ordre 0,001 mgr. par centimètre cube.

Nous avons fait plusieurs dosages sur trois immunsérums ayant un titre précipitant élevé, et obtenus en injectant, à des lapins, des antigènes arsenicaux. Il ne nous a jamais été possible de déceler la présence d'arsenic dans ces immunsérums.

Ces résultats prouvent dans le cas présent que le groupe spécifique de la molécule antigénique n'entre pas dans la constitution de l'anticorps.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de nos expériences qui ont porté, tant sur les dérivés des protéides que sur les substances chimiquement définies, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Tous les composés que nous avons examinés ont manifesté un certain pouvoir antigénique. Injectés aux animaux, ils ont provoqué la formation d'anticorps que nous avons pu mettre en évidence, *in vitro*, par des réactions biochimiques, *in vivo*, par des réactions biologiques et souvent même par les deux moyens.

Dans la recherche des facteurs de spécificité de nos antigènes, nous avons fait les constatations suivantes :

1° Les noyaux cycliques contenus dans les protéides jouent un très grand rôle. Tous les traitements chimiques que nous avons fait subir aux protéides, ont atteint les cycles aromatiques et nous avons toujours constaté la disparition de la spécificité d'origine du protéide initial ;

2° Parmi tous les amino-acides à structure aromatique, contenus dans le sérum que nous avons utilisé, la tyrosine semble avoir une influence prédominante. Cette hypothèse s'est trouvée confirmée lorsque nous avons réussi à immuniser les animaux à l'aide de certains composés à base de tyrosine.

3° Les modifications chimiques apportées aux protéides détruisent les caractères d'origine et confèrent, à ces protéides, un pouvoir spécifique nouveau qui est en rapport avec la nature du groupe chimique fixé sur les noyaux aromatiques. Nous avons pu ainsi différencier facilement, grâce aux immuno-réactions, les protéides nitrés des protéides aminés ; il nous a même été possible de séparer sérologiquement les azoprotéides préparés à partir d'acides arylaminés différents. L'espèce des protéides en cause ne jouant plus qu'un rôle très effacé, le radical chimique détermine rigoureusement la spécificité. Le simple changement du métalloïde entrant dans le

diazo (As, S ou C) bouleverse le caractère spécifique de l'antigène. De plus, la position du groupement acyl sur le noyau benzoïque a une action déterminée sur la formation des anticorps.

Il est particulièrement intéressant de signaler qu'en comparant l'action inhibitrice de divers haptènes de constitution connue, sur la réaction de précipitation antigène-anticorps, on peut indiquer, avec précision, quelques points de structure de l'antigène qui a été utilisé pour l'immunisation.

1° Les aminoprotéides se sont révélés d'excellents antigènes. Tout caractère d'origine ayant disparu, ils ont acquis une spécificité propre. Leur pouvoir sensibilisant est très marqué également : ils provoquent, chez l'animal d'expérience, un état allergique facile à mettre en évidence, principalement à l'aide des réactions cutanées.

5° Les substances chimiquement définies dans lesquelles la tyrosine remplace la molécule de protéide, se sont montrées capables de susciter, *in vivo*, la formation de précipitines décelables par les réactions habituelles. Le titre des immunisérums obtenus a été cependant toujours plus faible que dans le cas des vrais antigènes.

Ces composés à base de tyrosine ont été également employés pour déclencher des réactions biologiques ; ils ont donné des résultats très nets, notamment pour la mise en évidence du phénomène de réactivité locale cutanée, en suivant la technique décrite par SHWARTZMAN. Cette réaction n'avait jamais été obtenue jusqu'alors en partant de simples substances chimiques, ce qui nous a incité à étudier l'histogénèse de l'inflammation.

7° Nous avons prouvé que les antigènes azoïques se coupent dans l'organisme en libérant des produits aminés. L'absence de réactions croisées entre azo et amino-protéides nous a amenée à penser que c'est l'acide arylaminé libéré progressivement après l'injection d'azoprotéide qui sensibilise l'animal d'expérience et non l'aminoprotéide. Les réactions d'inhibition ont, du reste, mis en valeur le rôle capital de ces haptènes arylaminés, dans la spécificité des azoprotéides.

8° Le résultat de nos expériences sur la recherche de l'arsenic dans un immunosérum, ne nous a fourni aucune preuve de la présence, même minime, de l'antigène dans l'anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- ADANT (M.). — Pouvoir antigénique des protéides iodés. *Arch. intern. Méd. expér.*, 1930, p. 629.
- Etudes immunologiques des dérivés benzoylés des protéides. *Arch. intern. Méd. expér.*, 1934, p. 67.
- APITZ (K.). — A study of the generalized Shwartzman phenomenon *Journ. of Immun.*, 1935, t. **XXIX**, p. 355.
- Studies on the chemical nature of Shwartzman-active substances, *Journ. of Immun.*, 1935, t. **XXIX**, p. 343.
- ARTHUS (M.). — Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 817.
- ARTHUS (M.) et BRETON (M.). — Lésions cutanées produites par les injections de sérum de cheval chez le lapin anaphylactisé par et pour le sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. **LV**, p. 1478.
- ASCHOFF (L.). — Das Allergieproblem von Standpunkt des pathologischen Anatomien. *Med. Welt.*, 1937, p. 1023.
- AVERY (O.-T.) et GOEBEL (W.). — Chemo-immunological studies on carbohydrate proteins. *Journ. of exper. Med.*, 1931, t. **LIV**, p. 437 ; 1933, t. **LVIII**, p. 731.
- BAUER (H.) et STRAUSS (E.). — Beiträge zur Kenntnis substituielter Proteine-nitrierung und-jodierung des Globins. *Biochem Zeitschr.*, 1929, t. **CCXI**, p. 163.
- BERGER (E.) et ERLNMEYER (H.). — Stoffliche Beziehungen zwischen Antigen und Antikörper. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1932, t. **CXIII**, p. 79.
- Ueber immunchemische Untersuchungen in der Pyrazolon-Reihe. *Arch. Pathol. und Pharmacol.*, 1935, t. **CLXXVII**, p. 116.
- BERGER (E.), ERLNMEYER (H.) et LÉO (M.). — Eine Methode zur Bestimmung eines Antikörper-Hapten-Gleichgewichtes. *Biochem. Zeitschr.*, 1935, t. **CCLXVI**, p. 355.
- BESREDKA (A.). — Anaphylaxie et Antianaphylaxie, 1 vol. Paris, 1917, Masson, édit.
- Les Immunités locales, 1 vol. Paris, 1937, Masson, édit.
- BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. *Revue d'Immunologie*, 1935, t. **I**, p. 553-569 ; 1936, t. **II**, p. 113-144.
- Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries. Rapport présenté au *I^{er} Congrès intern. des Microbiol. de langue française*. Paris, oct. 1938.
- BOIVIN (A.), MESROBEANU (L.) et (I.). — Préparation et propriétés biologiques d'une substance non protéique, à la fois toxique, spécifique et immu-

- nisante existant dans les formes S. du b. d'Aertrycke et du b. de Gärtner et manquant dans les formes R des mêmes bactéries. *Arch. roumaines de Pathol. exp. et Microbiol.*, 1935, t. VIII, p. 45-86.
- BORDET (J.). — Immunité, antigènes, anticorps, in *Traité de Physiologie de Roger et Binet*, 1926, p. 428, 1 vol. Paris. Masson, édit.
- BORDET (P.). — Contribution à l'étude de l'allergie non spécifique. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, t. CVI, p. 1251.
- BOYD (W.) et HOOKER (S.). — Some analyses of azoproteins : casein, gelatin, and zein coupled with arsanilic acid. *Journ. of Biol. Chem.*, 1934, t. CIV, p. 329.
- DALE (H. H.). — The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. *Journ. of Pharmacol.*, 1913, t. IV, p. 167.
- DOERR (R.). — Allergie und Anaphylaxie. In *Handbuch der pathogen Mikroorganismen*, Kolle et Wassermann, 1929, III^e éd., t. I, pp. 759-1008.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (R.) et KOSSOVITCH (N.). — Globules rouges et Immunité. *Ann. Institut Pasteur*, 1933, t. LI, p. 149.
- Sur la nature des agglutinogènes des globules rouges des différents groupes. *Ann. Institut Pasteur*, 1935, t. LV, p. 331.
- Antigènes, hétéro-antigènes et haptènes, 1 vol. Paris, 1937, Baillière, édit.
- Pouvoir antigénique spécifique de divers isomères d'une même substance. *Revue d'Immunologie*, 1937, t. III, n° 5.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (R.), KOSSOVITCH (N.) et ISHII (S.). — Haptènes et inhibition du pouvoir hémolytique de certains immunsérums. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, t. CXXII, p. 1045.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (R.), KOSSOVITCH (N.), Mlle ARMAND (Y.) et ADRA (Ch.). — Spécificité chimique et spécificité sérologique. Rapport présenté au X^e Congrès de Chimie. Rome, mai 1938.
- FIERZ (H. E.), JADASSOHN (W.) et STOLL (W.). — Anaphylactic sensitization with chemically definite compounds. *Journ. of exper. Med.*, 1937, t. LXV, p. 339.
- Azofarbstoffe und Immunbiologie. Aufhebung anaphylaktischer Azoprotein-Ueberempfindlichkeit durch p-Phenyl-arsinsäure-azofarbstoffe. *Helvetica Chimica Acta*, 1937, t. XX, p. 1059.
- FIERZ (H. E.), JADASSOHN (W.) et ZURCHER (W. F.). — Azofarbstoffe und Immunbiologie Schultz-Dale'sche Versuche mit bis p-succinanilsäure-azo-resorcine. *Helvetica Chimica Acta*, 1937, t. XX, p. 16.
- FORSSMAN (J.). — Eine Immunitätsfrage im Lichte der heterogenetischen Forschung. *Wien. kl. Woch.*, 1929, p. 669.
- GRATIA (A.) et LINZ (R.). — Relations entre le phénomène d'Arthus et le phénomène de Schwartzman. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1933, t. LI, p. 89.
- HALBAN (J.) et LANDSTEINER (K.). — Ueber Unterschiede des fötalen Blutserums und über eine agglutinations und fällungshemmende Wirkung des Normalserums. *Münch. med. Woch.*, 1902, n° 12, p. 473.
- HAUROWITZ (F.). — Ueber die Bindung zwischen Antigen und präzipitierendem Antikörper. *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1937, t. CCXLV, p. 23.
- HAUROWITZ (F.) et KRAUS (F.). — Die Verteilung chemisch markierter Antigene in Organismen normaler und sensibilisierter Tiere. *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1936, t. CCXXXIX, p. 76.

- HEIDELBERGER (M.). — Immunochemistry. *Annual Review of Biochem. Stanford University Press*, 1932, t. I, pp. 655-674; 1933, t. II, pp. 503-520; 1935, t. IV, pp. 560-592.
- HOOKE (S. B.) et BOYD (W.). — The existence of Antigenic determinants of Diverse Specificity in a single Protein I Tyrosine and Histidin diazo-arsanilic acids as Haptens. *Journ. of Immunol.*, 1933, t. XXV, p. 61; 1934, t. XXVI, p. 469; 1936, t. XXX, p. 41.
- JACOBS (J.). — Serological studies on iodinated sera. I Precipitins and precipitogens. *Journ. of Immunol.*, 1932, t. XXIII, pp. 361-375.
- JOHNSON (B.) et KOHMANN (F.). — Studies on nitrated Proteins II The synthesis of 3-5 dinitrotyrosine. *Journ. of American Soc.*, 1915, t. XXXVII, p. 2168.
- KLOPSTOK (A.) et SELTER (G. E.). — Anaphylaxiereaktionen mit chemospezifischen Antigene. *Zeitschr. f. Immunf.*, 1929, t. LXIII, p. 463.
- KOSSOVITCH (N.) et ARMAND (Mlle Y.). — Mise en évidence par des réactions biologiques de l'état allergique d'animaux sensibilisés avec divers composés chimiques. Rapport présenté au 1^{er} Congrès Intern. des Microbiol. de langue française, oct. 1938, Paris.
- LANDSTEINER (K.). — Spezifische Serumreaktionen mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution. *Biochem. Zeitschr.*, 1920, t. CIV, p. 280.
- Ueber die Bedeutung der Protein-Komponente bei den Precipitinreaktionen der Azoprotein. *Biochem. Zeitschr.*, 1919, t. XGIII, p. 106.
 - The Specificity of serological reactions. 1 vol. London, 1936, Baillière, Tindal and cox.
- LANDSTEINER (K.) et CHASE (M. W.). — Studies on the sensibilization of animals with simple chemical compounds. IV Anaphylaxis induced by picrylchloride and 2-4 dinitrochlorobenzene. *Journ. of exper. Med.*, 1937, t. LXVI, p. 337.
- LANDSTEINER (K.) et JACOBS (J.). — Studies on the sensibilization of animals with simple chemical compounds. *Journ. of exper. Med.*, 1935, t. LXI, pp. 643-656; 1936, t. LXVI, pp. 625-715.
- LANDSTEINER and LAMPL (H.). — Ueber die Antigeneigenschaften von Azoprotein. *Biochem. Zeitschr.*, 1918, t. LXXXVI, p. 343; *Zeitschr. Immunf.*, 1917, t. XXVI, p. 293.
- LANDSTEINER (K.) and LEVINE (P. A.). — Experiments on anaphylaxis to Azoproteins. *Journ. of exper. Med.*, 1930, t. LII, p. 347.
- LANDSTEINER (K.) and van der SCHEER (J.). — Serological differentiation of steric isomers. *Journ. exper. Med.*, 1928, t. XLVIII, p. 315; 1929, t. L, p. 407.
- On the influence of acids groups on the serological specificity of azoproteins. *Journ. of exper. Med.*, 1927, t. XLV, p. 1045.
 - On the specificity of serological reactions with simple chemical compounds (inhibition reactions). *Journ. of exper. Med.*, 1931, t. LIV, p. 295; (precipitin reactions) 1932, t. LVI, p. 399.
 - Anaphylactic shock by azodyes. *Journ. of exper. Med.*, I, 1933, t. LVII, p. 633; II, 1938, t. LXVII, p. 79.
 - On cross reactions of immune sera to azoproteins. *Journ. of exper. Med.*, 1936, t. LXIII, p. 325.

- MACHEBŒUF (M. A.) et DIERYCK (J.). — Rapport sur le problème immuno-chimique des bacilles acido-résistants et en particulier des bacilles tuberculeux. *Le VI^e Congrès de Chimie biologique* (Lyon 1937), p. 261.
- MACHEBŒUF (M. A.), LÉVY (G.), BONNEFOI (A.) et FAURE (M.). — Etudes sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux (3 mémoires). *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1935, t. XVII, pp. 1194-1234.
- MARRACK (J. R.). — The chemistry of antigens and antibodies, 1 vol. 1934, London published by Majest. Stationery Office.
- MARRACK (J. R.) et SMITH (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the combination of antibodies with simple haptenes. *Brit. Journ. of exper. Pathol.*, 1932, t. XIII, p. 394.
- MESROBEANU (L.). — Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries. *Thèse de Sciences*, Strasbourg, 1936, Masson, édit.
- MEYER (Kurt). — Sur des anticorps à affinités multiples. *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, t. LVI, p. 684.
- Untersuchungen ueber Antigene Eigenschaften von Lipoiden, *Zeitschr. f. Immun. und exper. Therapie*. 1910, t. VII, p. 732 ; 1911, t. IX, p. 530 ; t. XI, p. 211.
- MICHELAZZI (L.). — Immunità locale e fenomeno di Sanarelli-Shwartzman. *Giornale di Batter. Immunol.*, 1935, t. XI, pp. 1212-1226 ; t. XV, p. 924.
- MORGAN (W. T. J.). — A conception of immunological specificity. *Journ. of Hygiene*, 1937, t. XXXVII, p. 372.
- NICOLLE (Maurice). — Les antigènes et les anticorps, 1 vol. Paris, 1920, Masson, édit.
- NITTI (F.) et BOVET (D.). — La coupure de certains azoïques dans l'organisme animal et les phénomènes allergiques provoqués par la sulfamido-chrysoïdine. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1937, t. XIX, p. 837.
- NITTI (F.), BOVET (D.) et Mlle DEPIERRE (F.). — Les phénomènes allergiques provoqués par certaines amines aromatiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, t. CXXIV, p. 1164.
- OBERMAYER (F.) et PICK (E. P.). — Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweisstoffe. *Wien. klin. Woch.*, 1906, t. XIX, p. 327-331.
- OBERMAYER (A.) et WILLHELM (A.). — Ueber formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweisskörpern. *Biochem. Zeitschr.*, 1912, t. XXXVIII, p. 331.
- PASTEUR-VALLÉRY-RADOT, MAURIC (G.) et Mme HOLTZER (ex-HUGO). — L'anaphylaxie expérimentale et humaine, 1 vol., 1937, Paris, Masson, édit.
- PAULY (H.). — Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweisses. *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1915, t. XCIV, p. 284.
- PEYRON (A.), POUMEAU-DELILLE (G.) et MERCIER (P.). — Sur l'origine et sur la signification de diverses variétés d'histiocytes observés dans les lésions inflammatoires et au cours des réactions d'immunité. *Note Pathologie expér.*, Séance du 13 juin 1938.
- PRAUSNITZ (C.) et KUSTNER (H.). — Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Centrbl. Bakt. 1 Abt. Orig.*, 1921, t. LXXXVI, p. 160.
- RAMON (G.). — Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue atoxique (anatoxine). *C. R. Acad. Sciences*, 1923, t. CLXXVII, p. 1338.
- Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, t. XL, pp. 1-10.

- Sur l'immunisation antitoxique et la production des antitoxines. Les mélanges d'antigène spécifique et de substances non spécifiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, t. XLVII, p. 339.
- Sur l'immunité antitoxique naturellement acquise. Son existence, son mécanisme. *Revue d'Immunologie*, juillet 1936, n° 4.
- RAMON (G.) et STAUB (A.). — Essais sur l'immunisation contre le charbon. *Revue d'Immunologie*, sept. 1936, n° 5.
- ROSENTHAL (S. R.). — The conjugation of Haptens *in vivo*. *Journ. of Immun.*, 1938, t. XXXIV, p. 251.
- RUFFILLI (D.). — Sulla possibilità di dimostrare un anticorpo antiemazie nel siero di malarico emoglobonurico da chinino. *Boll. Soc. italiana Biol. speriment.*, 1938, vol. XIII, fasc. 3.
- SACHS (H.). — Antigen und Antikörper. *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*, 1929, vol. XIII.
- SANARELLI (G.). — Le choléra expérimental. *Ann. Institut Pasteur*, 1924, t. XXXVIII, p. 11.
- SANDOR (G.). — Le problème des protéïdes. *Thèse de Sciences*, 1934. Paris, Doin, édit.
- SCHEN (M.). — Problèmes d'Asymétrie dans les processus bio-chimiques, 1 vol. 1936, Paris, Hermann et Cie, édit.
- SHERWOOD (N. P.). — Immunology., 1 vol., 1935. London, Henry Kimpton, édit.
- SHWARTZMAN (G.). — Phenomenon of local tissue reactivity and its immunological, pathological and clinical significance, 1 vol. 1937, New-York. Paul Horber, édit.
- TOPLEY (W. W. C.) and WILSON (G. S.). — The principles of Bacteriology and Immunity., 1 vol. 1937, London. Ed. Arnold, édit.
- TRÉFOUEL (J.) et Mme (J.), NITTI (F.) et BOVET (D.). — Activité du p-amino-phényl-sulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, t. CXXX, p. 736 ; *Ann. Institut Pasteur* 1937, t. LVIII, p. 30.
- TRÉFOUEL (J.) et Mme (J.), NITTI (F.), BOVET (D.) et HAMON (Mlle V.). — Rapport entre la vitesse de réduction des matières colorantes azoïques et leurs propriétés thérapeutiques. *Rapport présenté au I^{er} Congrès intern. des Microbiol. de langue française*, Paris, oct. 1938.
- UHLENHUTH (P.). — Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten, im besonderen zur differentialdiagnostischen Nachweise des Menschenblutes. *Deutsche med. Woch.*, 1901, pp. 82-260.
- VELLUZ (L.). — Chimie et Immunité. Rapport présenté au VI^e Congrès de Chimie Biologique, Lyon, oct. 1937, p. 173.
- WELLS (H. G.) — Chemical aspects of Immunology, 1 vol. 1929, New-York. The Chemical catalog., Co.
- WORMALL (A.). — The immunological specificity of chemically altered proteins. *Journ. of exp. Med.*, 1930, t. LI, p. 295.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE PREMIER.	
<i>Préparation des antigènes</i>	14
CHAPITRE DEUXIÈME.	
I. Immunisation des animaux	22
II. Sensibilisation des animaux	23
CHAPITRE TROISIÈME.	
<i>Immuno-réactions</i>	25
I. Expériences <i>in vitro</i>	25
II. Expériences <i>in vivo</i>	29
CHAPITRE QUATRIÈME.	
<i>Résultats</i>	34
I. Résultats obtenus avec les Xanthoprotéïdes	34
II. Résultats obtenus avec les Azoprotéïdes	42
III. Résultats obtenus avec les Aminoprotéïdes	48
VI. Résultats obtenus avec la Dinitrotyrosine.....	53
V. Résultats obtenus avec les Azotyrosines	55
CHAPITRE CINQUIÈME.	
<i>Observations histologiques sur le phénomène de réactivité locale</i>	59
CHAPITRE SIXIÈME.	
I. Etude du comportement de certains antigènes dans l'organisme..	62
A. — Réduction <i>in vitro</i>	62
B. — Réduction <i>in vivo</i>	64
II. Recherche de l'arsenic dans l'immunsérum d'un lapin ayant subi plusieurs injections d'un antigène arsenical.....	65
CONCLUSIONS.....	68
BIBLIOGRAPHIE	70

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Les Coferments.

Vu et approuvé :

Paris, le 10 janvier 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

